

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1
SCIENCE ET GEOGRAPHIE**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Physique

Présentée et soutenue publiquement par

Hugues Nury

le 19 juillet 2007

**ETUDES STRUCTURALES DU TRANSPORTEUR
MITOCHONDRIAL D'ADP ET D'ATP**

Composition du jury

Marc Le Maire	Rapporteur
Bruno Miroux	Rapporteur
Irmgard Sinning	Examinatrice
Edmund Kunji	Examineur
Eva Pebay-Peyroula	Directrice de thèse

Thèse préparée à l'Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel

Remerciements

C'est une belle période de quatre ans qui s'achève. Devant les paillasses de l'IBS, dans les rues de Grenoble et sur quelques parois rocheuses alentour, la vie a été pleine, avec des rebondissements et de la joie.

Merci **Eva** pour m'avoir accueilli et guidé en DEA d'abord, en thèse ensuite, et pour la quatrième année de celle-ci. J'ai toujours trouvé votre porte ouverte, un enthousiasme scientifique permanent, une foison d'idées. Merci **Marc** pour ton rôle de rapporteur, pour le tact tranquille qui accompagne la réalisation d'un article ou des conseils pour le choix d'un postdoc. Merci **Bruno** pour ton rôle de rapporteur, et tes talents de conteur d'histoires scientifiques lors des soirées du GDR. Thanks a lot **Irmi**; I was honoured you accepted to evaluate this work. Reading a french manuscript was not the easiest part! Thanks a lot **Edmund**; it was so interesting to share with an expert in the field, and I was really impressed by the passion you put into your science.

Merci aux seniors du labo, au sens large, pour leurs conseils avisés tout autant que pour leur présence amicale. Dans le désordre : **Richard** et sa gentillesse légendaire, **Franck** le Jack Johnson du LPM, **Corinne** et son bureau siège de maintes discussions, **Jacques** et son humour caustique, Laurence cristallographe affranchie, **Andrea** toujours avec le sourire, un mot gentil et des présentations bluffantes, **Lionel** spécialiste *es* mac et grand cynique, **Anne-Marie** pour la biologie moléculaire et les vannes qui renvoient dans les cordes. Merci beaucoup **Christine**, pour ton implication dans l'épineux problème de l'oligomérisation des AAC, des expériences de centrifugation jusqu'à la rédaction finale. Merci à **Nicole** et **Sylvie** pour leurs conseils concernant le Biacore, **Colette** pour les gels dérifat. Merci **Jo** pour les expériences de diffusion de neutrons. Merci **Gérard**, qui m'a laissé manipuler dans son laboratoire dans un contexte délicat.

Merci **Aurélien**, pour les échanges quotidiens à base de S^3 . Merci dans le désordre à **Véro**, **Georges**, **David**, **Manu**, **Sylvie**, **Iulia** et **Jo**, compagnons de bureau toujours patients face à mes marmonnements solitaires et autres interruptions musicales; les longues discussions du soir et du vendredi aprem me manqueront. Manqueront aussi les allées et venues dans l'algéco des deux petites blondes pendant ces derniers mois. Merci **Michel** toujours en avance d'un bricolage; Merci **Mada**, **Aurélien**, pour les bonnes pauses badminton-blabla entre midi et deux; Merci **Pauline**, conscrute de thèse désormais en avance; Merci **Céline** pour ton efficacité sans faille dans le labo, et je pense à toi chaque fois que je prends ma voiture! Merci à **Laure** et **Marianna**, qui ont essuyé les plâtres en me prenant comme encadrant. Au LPM, merci aussi à **Guillaume**, **Julien**, **Eric**, **Céline**, **Manue**, **Andreja**, **Vivianna**, **Cécile** et les autres. Merci aux petits jeunes et moins jeunes du LIM pour leur accueil toujours amical, leur café toujours avec gâteaux, **Benoît**, **Marjo**, **Florent** et les autres.

Je ne vois pas nettement la frontière qui sépare le labo du reste : j'ai pensé à

mes manip au lent rythme de l'attente à un relais ; j'ai lu des topos pendant que mes gels migraient ; il y a même eu des créneaux ESRF coïncidant avec la sortie des bars le samedi soir ! C'est un des aspects géniaux de ce métier obsédant, de bien se mélanger à toute la vie. Merci aussi, donc, à : **Damien**, compagnon et premier de cordée plus souvent qu'à son tour ; **Céc** et nos repas hebdomadaires à H2 aux thèmes récurrents ; **Ju** de cocher-cochon à Carqueiranne en passant par la Corse ; **Yaume** voyageur semi-professionnel ; **Seb** conseiller matrimonial semi-amateur ; **Antoine et Zgu** pour les voyages et soirées inopinées ; **Raph, Robin, Lolo**, de loin en loin mais sans distance ; **Anne** toujours partante pour une bière ou une rando ; à tous ceux avec qui j'ai eu la chance de faire un bout de chemin.

Il paraît que les mélèzes dans le Beaufortin poussent toujours par deux. **Delph**, t'ai-je jamais dit que tu me faisais penser à un gros mélèze ? Que la neige, le soleil ou la pluie, le mélange tourbe parisienne - terreau alpin, nous permettent de mêler nos branches encore longtemps.

Mon **papa** est prof de physique, ma **maman** prof de biologie. Je me souviens, il y a très longtemps, il m'ont expliqué que j'étais un peu à l'interface entre eux deux. A l'époque je n'avais pas exactement compris, mais à présent tout est clair ! A eux deux et avec ma soeur **Cécile**, source intarissable de gentillesse et de compréhension, il me permettent d'avancer. Merci **Richard**, albatros de l'ultimate, tennisman-skieur-codeur démultiplié.

Table des matières

Avant-propos	xiii
1 Introduction	1
1.1 La mitochondrie	1
1.2 Les transporteurs mitochondriaux	5
1.2.1 Caractéristiques de la famille	5
1.2.2 Insertion dans la membrane interne	7
1.3 Le transporteur d'ADP et d'ATP	9
1.3.1 Une protéine importante, abondante, largement étudiée	9
1.3.1.1 Caractéristiques et spécificité du transport	10
1.3.1.2 Inhibiteurs : actractusides et acides bongkré- kiques	11
1.3.1.3 Inhibiteurs et conformations	13
1.3.1.4 Isoformes	14
1.3.1.5 Pathologies associées	15
1.3.2 Aspects structuraux	15
1.4 Apoptose et mitochondrie	19
1.4.1 La mort cellulaire programmée	19
1.4.2 Quelle perméabilisation et comment advient-elle ?	20
2 Etat oligomérique de l'AAC	23
2.1 Un tour d'horizon de la littérature	23
2.1.1 Pourquoi certaines protéines s'organisent-elles en oligo- mères ?	23
2.1.2 Assemblage oligomérique des transporteurs mitochondriaux	27
2.1.2.1 Chimères dimériques	29
2.1.2.2 Pontage chimique	31
2.1.2.3 Electrophorèse native	32
2.1.2.4 Stoechiométrie de liaison des inhibiteurs	33
2.1.2.5 Stoechiométrie du transport des nucléotides	34
2.1.2.6 Autres approches	35
2.1.2.7 Tétramères et autres complexes compliqués	35
2.1.3 Définition d'une interface d'interaction	35
2.1.4 Considérations de symétrie	37
2.2 Analyse de l'état oligomérique par ultracentrifugation analytique	40

2.2.1	Principe et méthodes	40
2.2.1.1	Principe	40
2.2.1.2	Protocole expérimental – paramètres utilisés . . .	40
2.2.1.3	Préparation des échantillons	42
2.2.1.4	Résolution de l'équation de transport, coefficients de sédimentation et de diffusion	42
2.2.2	Les volumes partiels spécifiques du Lapao et du mélange Lapao-lipides	44
2.2.2.1	Lapao	45
2.2.2.2	Mélange de Lapao et de lipides : échantillons « à l'identique »	45
2.2.3	Sédimentation du complexe membranaire bAAC1-Lapao- lipides	49
2.2.3.1	Flottaison en tampon H ₂ O	50
2.2.3.2	Flottaison en tampon D ₂ O	50
2.2.3.3	La protéine est monomérique	52
2.2.4	Figure récapitulative	54
2.3	Diffusion de neutrons aux petits angles	56
2.3.1	Principe	56
2.3.1.1	Production de neutrons	56
2.3.1.2	Interaction des neutrons avec la matière	57
2.3.1.3	Diffusion par une solution de macromolécules . . .	57
2.3.1.4	Approximation de Guinier, rayon de giration, masse particulaire	58
2.3.1.5	Variation du contraste	60
2.3.2	Dispositif expérimental – traitement des données	61
2.3.2.1	Préparation des échantillons	61
2.3.2.2	Enregistrement et traitement des données	61
2.3.3	Résultats	62
2.3.3.1	Détermination du point d'annulation des contrastes .	62
2.3.3.2	Masse et rayon de la particule	64
2.4	Que nous disent les cristaux ?	72
2.4.1	De la membrane au modèle cristallographique	72
2.4.1.1	Des mitochondries à la goutte de cristallisation .	72
2.4.1.2	Autour des cristaux	74
2.4.1.3	Des cristaux au modèle atomique	75
2.4.2	Analyse des empilements cristallins	77
2.4.2.1	Description de l'empilement	77
2.4.2.2	Anisotropie des données	77
2.4.2.3	Pourquoi exclure les voisins tête-bèches ?	78
2.4.2.4	Description des interfaces	78
2.4.2.5	Quelle pertinence biologique pour les interfaces dans les cristaux ?	80
2.4.3	Les cardiolipides liés à la protéine	84
2.4.3.1	Les lipides des complexes membranaires	84

2.4.3.2	Les cardiolipides : une particularité mitochondriale?	85
2.4.3.3	Trois cardiolipides entourent l'AAC	87
2.4.3.4	Quel(s) rôle(s) pour les cardiolipides de l'AAC?	90
2.5	Discussion	93
3	Vers la structure d'une autre conformation	97
3.1	Beaucoup de détergent et de lipides	97
3.1.1	Un mélange complexe	97
3.1.2	Quelle stratégie adopter?	99
3.1.3	Essais divers autour de la séparation des constituants du mélange	101
3.1.3.1	Séparation de l'excès de détergent par gradient de densité	101
3.1.3.2	Utilisation d'amphipols	103
3.2	Utilisation de partenaires protéiques	105
3.2.1	La cyclophiline D et VPR	105
3.2.2	Production et purification de la cyclophiline D bovine	106
3.2.2.1	Constructions réalisées	106
3.2.2.2	Expression dans <i>E. coli</i>	106
3.2.2.3	Tentatives de purification	107
3.2.3	Production et purification de la cyclophiline D humaine	110
3.2.4	Peut-on expliquer la différence de comportement entre les constructions protéiques?	112
3.2.5	Choix du peptide de Vpr	112
3.3	Quelles interactions avec le transporteur ADP-ATP?	115
3.3.1	Préparation des échantillons d'AAC	115
3.3.2	Tests d'interaction	115
3.3.3	Discussion	118
4	Cristallisation des protéines membranaires	123
4.1	L'étude structurale des protéines membranaires	123
4.1.1	Etat des lieux des connaissances structurales	124
4.1.2	Contours du domaine de recherche	126
4.2	Tensio-actifs, détergents et cristallogénèse	127
4.2.1	Les molécules tensio-actives	127
4.2.2	Autour de la cristallogénèse	129
4.3	Cristallisation en champ magnétique	131
4.3.1	Principe et effet de l'action d'un champ magnétique	131
4.3.2	Description de l'expérience	132
4.3.3	Autour de l'effet d'orientation	132
4.4	Détection par diffraction de cristaux en phase cubique de lipides	135
4.4.1	Phases cubiques de lipides et protéines membranaires	136
4.4.2	Notions de base concernant les phases cubiques	137
4.4.3	Un prototype de plaque pour la détection directe par diffraction	139

4.4.4	Résultats	142
5	Conclusions et perspectives	145
5.1	Conclusions	145
5.2	Perspectives	146
5.3	Hypothèses sur le mécanisme de transport	147
5.4	Apprentissages	155
Annexes		157
	Purification de bAAC1	157
	Techniques de dosage	158
	Mémento de cristallographie	160
	Clonage, expression et purification de bCyD entière ou tronquée . . .	162
	Expression et purification de hCyD _t	164
	Quantifier des interactions par la résonance plasmonique de surface . .	165
	Programmes utilisés	175
	Publications	176
Bibliographie		177

Table des figures

1.1	Structure et diversité de la mitochondrie	3
1.2	Protéines de la chaîne respiratoire	5
1.3	Les transporteurs mitochondriaux humains	6
1.4	Import des transporteurs mitochondriaux	8
1.5	Molécule d'ADP et conditions de transport	11
1.6	Les inhibiteurs de l'AAC	12
1.7	Inhibiteurs et conformations	14
1.8	Structure du complexe bAAC1-CATR	17
1.9	Séquence signature des AAC	18
1.10	Déclenchement de l'apoptose	19
2.1	Oligomères de complexes membranaires	26
2.2	Longueur du segment non structuré pour les chimères dimériques	30
2.3	L'échange ADP-ATP suit une stoechiométrie 1 :1	34
2.4	Dimérisation du transporteur de phosphate	36
2.5	Où pourrait se trouver l'interface de dimérisation ?	38
2.6	Dimérisation et pseudo-symétrie d'ordre trois	39
2.7	Echantillons utilisés en AUC et SANS	43
2.8	Sédimentation du Lapao en H ₂ O et D ₂ O	46
2.9	Volume partiel spécifique du Lapao	47
2.10	Sédimentation des échantillons « à l'identique » en D ₂ O	48
2.11	Sédimentation du complexe protéique en H ₂ O	51
2.12	Sédimentation du complexe protéique en D ₂ O	52
2.13	Les couples (\bar{v}_{d+l}, B) sont en accord avec un modèle monomérique	53
2.14	Résumé des expériences de sédimentation de vitesse	55
2.15	Variation de contraste	60
2.16	Deutération des échantillons	63
2.17	Détermination graphique du matching point	64
2.18	Représentation de Guinier des spectres de diffusion	65
2.19	Rayon de giration pour un complexe bAAC1-détergent	70
2.20	Empilements cristallins	79
2.21	Anisotropie des données de diffraction	80
2.22	Interactions entre monomères voisins	81
2.23	Surface latérale et conservation	83

2.24	Influence des cardiolipides sur la fixation du PYM	86
2.25	Les cardiolipides dans les deux formes cristallines	88
2.26	Interactions des cardiolipides avec la protéine	89
2.27	Cardiolipides et pseudo-symétrie interne	90
2.28	Rôles des cardiolipides	91
3.1	Chromatographie d'exclusion de taille du complexe bAAC1	98
3.2	Pistes cristallines en sortie de gradient de saccharose	101
3.3	Migration du complexe bAAC1 dans un gradient de saccharose . .	102
3.4	Suppression des variations de fluorescence en présence d'amphipols	103
3.5	Rétention d'un complexe protéine–amphipol biotinyté	104
3.6	Constructions de cyclophiline D	107
3.7	Essais de purification de la cyclophiline D bovine	109
3.9	Cristaux et diffraction de la cyclophiline D humaine	110
3.8	Purification de la cyclophiline D humaine	111
3.10	Cyclophilines D humaine et bovine	113
3.11	Protéine et peptide Vpr	114
3.12	bAAC1 n'est pas retenu sur une résine fonctionnalisée	116
3.13	Elution différentielle de hCyD _t et bAAC1	117
3.14	Mesures d'interaction par résonance plasmonique de surface . . .	119
4.1	Diagramme de phase et cristallisation	130
4.2	Effet d'orientation des cristaux en présence d'un champ magnétique	133
4.3	Phases cubiques lipidiques	138
4.4	Mécanisme de cristallisation en phase cubique	140
4.5	Le prototype de plaque de cristallisation	141
4.6	Cristaux dans la plaque pour les phases cubiques	142
4.7	Diffraction des cristaux dans la plaque	144
5.1	L'intérieur de la cavité près de P229	149
5.2	Autres éléments d'asymétrie	150
5.3	Surface hydrophobe de h₁₋₂	152
5.4	D'autres lipides pour protéger h₁₋₂	152
5.5	CDL801 et points de pivots	154
6	Dérive des lignes de base (SPR)	168
7	Mesures de SPR pour le couple bAAC1-Vpr	171
8	Mesures de SPR pour le couple bAAC1-hCyD _t	173
9	Mesures de SPR avec un mélange Lapao–lipides	174

Liste des tableaux

1.1	Quelques étapes marquantes de l'étude du transporteur d'ADP et d'ATP	9
1.2	Les protéines potentiellement impliquées dans le PTP	21
2.1	Expériences sur l'oligomérisation de la famille MCF	28
2.2	Constructions chimériques d'AAC	29
2.3	Paramètres utilisés en centrifugation analytique	41
2.4	Résultats d'AUC pour le détergent et les lipides	49
2.5	Résultats d'AUC pour les complexes protéiques	50
2.6	Longueurs de diffusion de quelques éléments	57
2.7	Paramètres déterminés en SANS	66
2.8	Statistiques de diffraction de bAAC1-CATR purifié à faible force ionique	76
2.9	Interactions entre monomères voisins	78
5.1	Mécanisme schématisé du transport de l'ADP	155
2	Récapitulatif des mesures d'interaction par SPR	169

Abréviations

Noms de protéines	
AAC	Transporteur d'ADP-ATP
AqpZ	Aquaporine de <i>E. coli</i>
bR	Bactérorhodospine
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
MCF	Famille des transporteurs mitochondriaux
PTP	Pore de transition de perméabilité
TIM	Translocase de la membrane interne
TOM	Translocase de la membrane externe
SecA	Protéine présentatrice du translocon
SecYEG, SecYEβ	Translocon de <i>E. coli</i> , de <i>Methanococcus jannaschii</i>
VDAC	Voltage Dependant Anion Channel, porine de la membrane externe
Noms de petites molécules	
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADP	Adénosine di-phosphate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine tri-phosphate
BA	acide bongkréique
(C)ATR	(carboxy)atractyloside
GTP	Guanosine tri-phosphate
HTP	Hydroxylapatite
MPD	2-méthyl-2,4-pentanediol
Oxo.	Oxoglutarate (figure)
SDS	sodium dodecyl sulfate
Techniques expérimentales	
AUC	Ultracentrifugation analytique
AFM	Microscopie à force atomique
FRET	Transfert d'énergie de résonance de fluorescence
SANS	Diffusion de neutrons aux petits angles
SPR	Résonance plasmonique de surface
Divers	
Φ^3	Phases cubiques de lipides
BHM	Mitochondries de cœur de bœuf
CMC	Concentration micellaire critique
IMS	Espace intermembranaire
IMPS	Surface minimales périodiques infinies
PDB	Protein Data Bank
RU	Unités arbitraire de SPR
tpm.	tour par minute

Avant-propos

Présentation du manuscrit

Le premier chapitre, l'introduction, présente le contexte de cette étude. Je présente successivement, du plus général au plus spécifique : la mitochondrie, la famille des transporteurs mitochondriaux puis les principales connaissances relatives au transporteur d'ADP et d'ATP. Une partie de la revue bibliographique se trouve déportée dans les chapitres de résultats. Ainsi l'oligomérisation est abordée dans le deuxième chapitre, et l'instantané des connaissances structurales de protéines membranaires dépeint dans le chapitre quatre.

Les descriptions du matériel et des méthodes utilisés sont également intégrées aux chapitres de résultats. Volontairement, certaines sont allusives et d'autres plus complètes. Ainsi les explications de cristallographie sont minimalistes : on les trouvera facilement ailleurs, très bien écrites. A l'inverse, l'ultracentrifugation analytique ou la diffusion de neutrons sont assez longuement présentées, équations à l'appui. Le choix du niveau de détail répond à un cahier des charges en deux points : le besoin de décrire pour m'approprier une méthode et le degré de difficulté à trouver une description équivalente.

Les résultats sont présentés en trois chapitres de tailles inégales.

Le chapitre deux traite de l'**état oligomérique de la protéine et des lipides structuraux**. Après un tour d'horizon de la littérature correspondante, je présente nos résultats d'ultracentrifugation analytique, de diffusion de neutrons aux petits angles et de cristallographie. Pour ces derniers, l'accent est porté autant sur l'oligomérisation que sur l'interprétation de la structure des lipides entourant la protéine.

Le chapitre trois s'intéresse aux **démarches visant à obtenir la structure d'une autre conformation de la protéine**. Il présente les termes du problème posé par la stabilisation du transporteur d'ADP et d'ATP et par le contrôle de son environnement. Il évoque rapidement des tentatives éparses pour résoudre ces problèmes, puis plus en détail un projet de détournement à des fins de purification d'interactions entre le transporteur et la cyclophiline D ou Vpr.

Le chapitre quatre rapporte **diverses expériences de cristallisation**. Ce chapitre est en partie indépendant de l'étude du transporteur d'ADP et d'ATP, puisqu'il décrit notamment un prototype de plaque de cristallisation adaptée aux phases cubiques de lipides. C'est autant un chapitre de mise en contexte que de résultats.

Enfin les conclusions, les perspectives de ce travail ainsi que quelques hypothèses trouvent leur place dans un dernier chapitre.

Participation aux travaux

La majeure partie des travaux rapportés ici résultent de collaborations. Les purifications de transporteur d'ADP et d'ATP sont réalisées dans les locaux de Gérard Brandolin (iRTSV) ; les expériences de diffusion de neutrons ont été

conduites avec Joseph Zaccaï (IBS-ILL), Christine Ebel (IBS) et Gérard Brandolin ; les expériences d’ultracentrifugation ont été réalisées puis interprétées par et avec Christine Ebel ; les clonages ont été menés avec l’aide d’Anne-Marie Di Guilmi (IBS) et d’Isabel Ayala (IBS) ; les purifications correspondantes ont impliqué Laure Rajat (IBS) ; Aurélien Deniaud (IBS) a participé aux expériences d’interactions ; la cristallisation en champ magnétique a été faite chez James Torbet (IBCP) et Eric Beaunon (CRETA) ; les tests du prototype de plaque de cristallisation ont été possibles grâce à l’aide de Jérémie Ohana (FIP-IBS). Bien sûr ma directrice de thèse Eva a orienté, animé et mis en musique l’ensemble de mon travail.

Chapitre 1

Introduction

1.1 La mitochondrie

Le cytosol des cellules eucaryotes présente des compartiments qui assurent des fonctions biologiques spécialisées, délimités par des membranes. Parmi ceux-ci, la mitochondrie remplit une fonction énergétique essentielle : la respiration cellulaire et la synthèse d'ATP, molécule qui alimente en énergie la plupart des processus cellulaires.

L'étymologie, du grec *mitos* (fil) et *chondros* (grain), évoque la forme ellipsoïdale de la mitochondrie présente sous forme de chapelets, des « *filaments* » de « *granules* » alignés, lors des premières observations par Kölliker, Flemming et Altmann au dix-neuvième siècle.

On sait aujourd'hui que la morphologie des mitochondries est à la fois complexe et dynamique [Okamoto et Shaw, 2005]. Cependant elles comprennent toujours une enveloppe formée de deux membranes. La plus extérieure est lisse, tandis que la membrane interne s'invagine pour former des crêtes mitochondriales.

Distribution cellulaire Les mitochondries sont présentes dans la plupart des cellules eucaryotes. Leur abondance et leur emplacement varient avec la fonction cellulaire et les besoins énergétiques locaux. Ainsi dans le muscle, elles sont nombreuses et se placent en regard des disques des myofibrilles ; dans le rein on les trouve dans la région basale où elles fournissent l'énergie pour les transports à travers la membrane. Les globules rouges en sont dépourvus.

D'où viennent les mitochondries ? L'endosymbiose d'une lignée bactérienne il y a 1,5 milliards d'années est à l'origine de l'apparition des mitochondries. La bactérie originale pourrait être apparentée aux α -protéobactéries de la famille des *Rickettsia* [Falah et Gupta, 1994], selon une théorie étayée par des arbres phylogénétiques d'ARN ribosomiaux [Yang et al., 1985], de chaperonnes [Viale et al., 1994] et de cytochromes [Sicheritz-Pontén et al., 1998].

Au cours de l'évolution, la mitochondrie s'est spécialisée dans la production d'énergie en conditions aérobie; son patrimoine génétique a été en partie perdu ou transféré vers celui de l'hôte; elle a développé un système d'import de protéines en provenance du cytosol (pour revue voir Neupert et Herrmann [2007]).

Le génome mitochondrial Aujourd'hui les produits des gènes mitochondriaux, chez l'homme, sont treize sous-unités protéiques impliquées dans la phosphorylation oxydative, 2 ARN ribosomiaux et 22 ARN de transfert. Les gènes mitochondriaux évoluent de six à dix-sept fois plus rapidement que leurs équivalents du noyau, et d'intéressants travaux corrélient les migrations de populations au patrimoine génétique de l'organite [Torroni et al., 1993, Behar et al., 2006]. Un spectre étendu de maladies génétiques, transmises par la mère, sont associées à des mutations de l'ADN mitochondrial, comme par exemple le syndrome de Leigh ou une tumorigénicité accrue dans le cancer de la prostate.

Organisation de la mitochondrie La membrane externe de la mitochondrie est lisse; elle contient en abondance une protéine homologue des porines bactériennes appelée VDAC (acronyme de *Voltage Dependant Anion Channel*), qui la rend perméable aux molécules de masse inférieure à 1000 Da. La composition de l'espace intermembranaire est donc voisine de celle du cytosol.

La membrane interne présente des repliements, les crêtes mitochondriales (figure 1.1), dont l'abondance dépend de l'activité respiratoire. Elle s'invagine en tubes ou en saccules qui pénètrent profondément à l'intérieur de l'organite et augmentent la surface d'échange entre compartiments. Ces saccules sont connectées à la partie périphérique de la membrane interne par des jonctions généralement cylindriques, de diamètre typiquement compris entre 30 et 40 nm. C'est la tomographie électronique qui permet de visualiser l'organisation interne de la mitochondrie [Mannella, 2006], et au-delà des généralités que nous venons de rapporter, cette technique met en évidence la diversité des structures formées par la membrane interne.

L'identité des protéines qui forment ou favorisent ces structures, tout comme la relation entre ces structures et la fonction des mitochondries, restent mal connues. Des exemples frappants mettent néanmoins en lumière l'existence à défaut de la compréhension de telles relations. Ainsi un défaut d'assemblage de l'ATP-synthase de levure peut conduire à des organisations en oignon des mitochondries (Arselin et al. [2004] et figure 1.1.g). Une tomographie de mitochondrie d'un patient atteint du syndrome de Senger (une déficience en transporteur d'ADP et d'ATP) montre de nombreuses vésicules de membrane interne non connectées à l'espace intermembranaire (figure 1.1.f).

Diversité des rôles cellulaires de la mitochondrie Le rôle principal joué par la mitochondrie est d'assurer la synthèse d'ATP. Via un transfert d'électrons, les protéines de la chaîne respiratoire créent un gradient de protons entre la

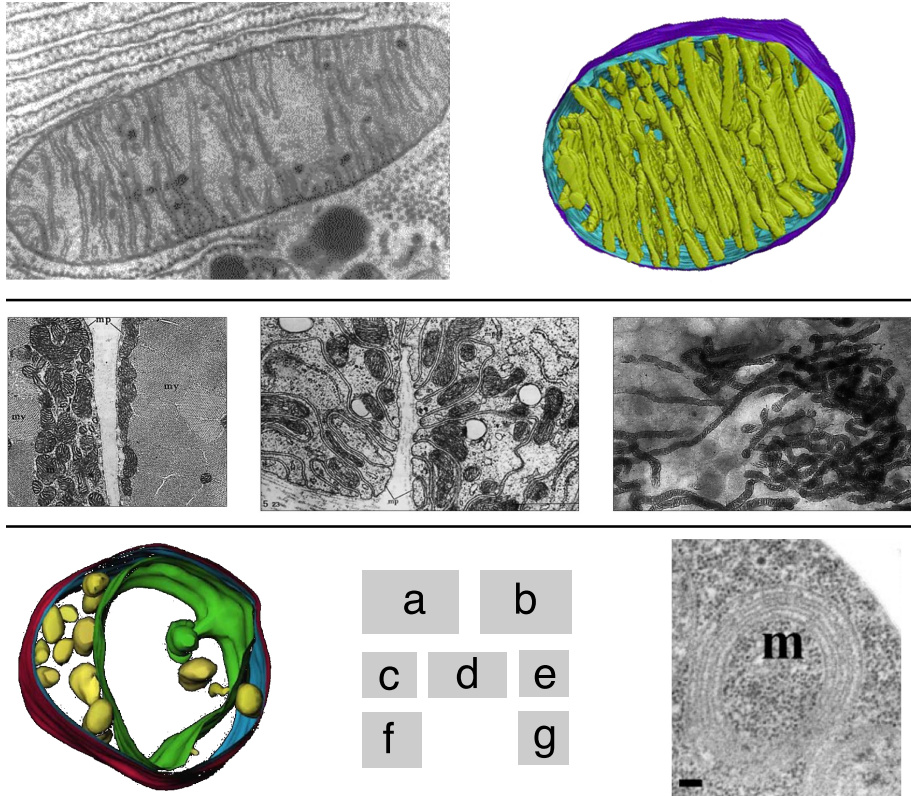


FIG. 1.1 – **Structure et diversité de la mitochondrie.** (a) et (b) Vues typiques en microscopie électronique et tomographie électronique de mitochondries. (c) Association mitochondries-myofibrilles de muscle squelettique de cobaye. (d) Association mitochondrie-membrane plasmique de l'épithélium d'insecte. (e) Mitochondries en forme de serpent d'une cellule épithéliale d'escargot. (f) Mitochondrie de cœur d'un patient atteint du syndrome de Senger [Mannella, 2006]. (g) Mitochondrie dans laquelle la sous-unité e/g de l'ATP-synthase a été supprimée [Arselin et al., 2004].

matrice et l'espace intermembranaire (figure 1.2). Ce gradient dissipé par l'ATP-synthase lui fournit l'énergie nécessaire à la catalyse du couplage d'ADP et de phosphate inorganique en ATP. La découverte de ce couplage chimio-osmotique valut à Mitchell [Mitchell, 1961] le prix Nobel en 1978.

Les dernières étapes du métabolisme du glucose (avec le cycle de Krebs) et des acides gras (dont la β -oxydation) prennent place dans la matrice mitochondriale. Elle intervient également dans la protection contre le stress oxydant. Elle assure certaines étapes de la biosynthèse d'acides aminés ou de bases nucléotidiques.

Enfin la mitochondrie est impliquée dans l'apoptose, selon un mécanisme encore mal connu qui conduit à la perméabilisation de l'organite et au relargage du cytochrome C dans le cytosol, puis à l'activation des caspases responsables de la mort cellulaire (voir également la section *Apoptose et mitochondrie* page 19).

Morphologie et dynamique Les mitochondries sont des organites dynamiques qui changent de taille, de forme, se déplacent sur de longues distances, s'interconnectent. Les mécanismes de fusion et de fission, à l'origine de ces interconnexions ont été largement étudiés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (pour revue voir Okamoto et Shaw [2005]). Ces mécanismes impliquent des protéines conservées parmi les eucaryotes supérieurs.

La fusion est un processus fonction de la présence de GTP et d'un potentiel de membrane. Elle conduit à la fusion du pôle d'une mitochondrie avec une autre et à la continuité de leurs matrices. Les protéines Fzo1p, Mgm1p (deux GTPases conservées) et Ugo1p (une protéine située dans la membrane externe contenant entre autres deux motifs semblables à ceux tripliqués chez les transporteurs mitochondriaux, [Coonrod et al., 2007]) interviennent dans la fusion, qui s'opère selon un modèle séquentiel de rapprochement des organites suivi du contact, de la fusion de la membrane externe puis de la membrane interne.

La fission fait intervenir notamment une GTPase cytosolique homologue de la dynamine (Dnm1) et une protéine de la membrane externe (Fis1). L'idée générale est que l'interaction avec Fis1 permet l'assemblage en homo-oligomères de Dnm1 ; ces oligomères sont capables d'opérer une fission dépendante de la présence de GTP. Dans le détail, différents mécanismes impliquant également d'autres partenaires sont décrits. Les protéines de fission pourraient participer à la fragmentation mitochondriale qui intervient pendant l'apoptose [Youle et Karbowski, 2005].

Protéines de la membrane interne de structures connues Seules quelques structures de protéines membranaires mitochondriales sont connues. Ce sont exclusivement des structures de protéines qui participent à la respiration. Une vue structurale de la chaîne respiratoire est illustrée par la figure 1.2.

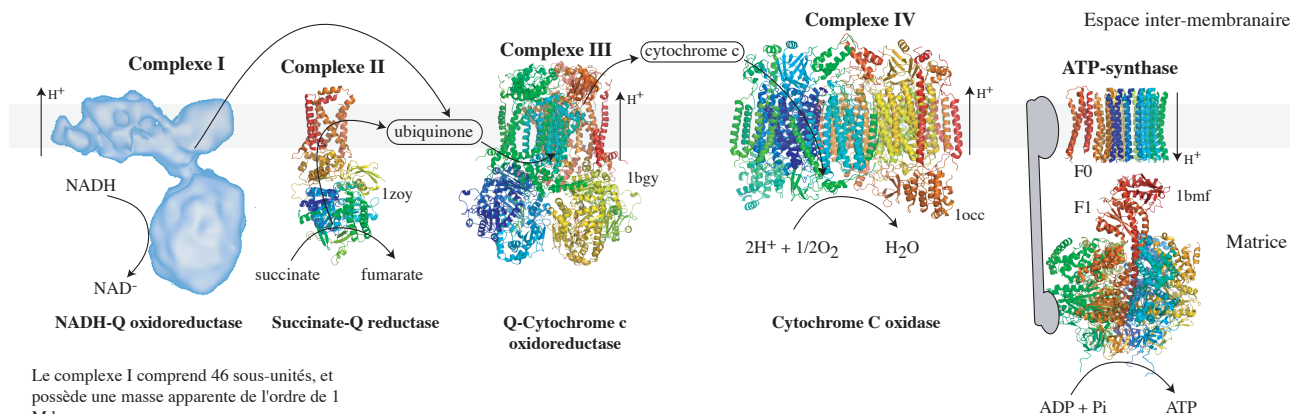


FIG. 1.2 – **Vue structurale de la chaîne respiratoire.** Les structures atomiques obtenues par cristallographie des complexes **II** de porc [Sun et al., 2005], **III** de bœuf [Iwata et al., 1998], **IV** de bœuf [Tsukihara et al., 1996] et de l'**ATP-synthase** [Stock et al., 1999] sont représentées. L'enveloppe à basse résolution du complexe I obtenue par microscopie électronique est celle de Grigorieff [1998].

1.2 Les transporteurs mitochondriaux

Les transporteurs mitochondriaux forment une famille de protéines qui assurent l'import et l'export des petites molécules à travers la membrane interne des mitochondries.

1.2.1 Caractéristiques de la famille

Actuellement on compte chez l'homme plus de 40 membres de la MCF (acronyme de *Mitochondrial Carrier Family*), dont quelques caractéristiques sont données dans la figure 1.3. Toutes les protéines de la MCF sont codées par des gènes nucléaires.

Triplication La séquence des transporteurs mitochondriaux est formée de trois parties homologues longues d'une centaine de résidus, issues d'un unique gène ancestral [Walker et Runswick, 1993, Fiermonte et al., 1999].

Pour chaque transporteur sont indiqués :

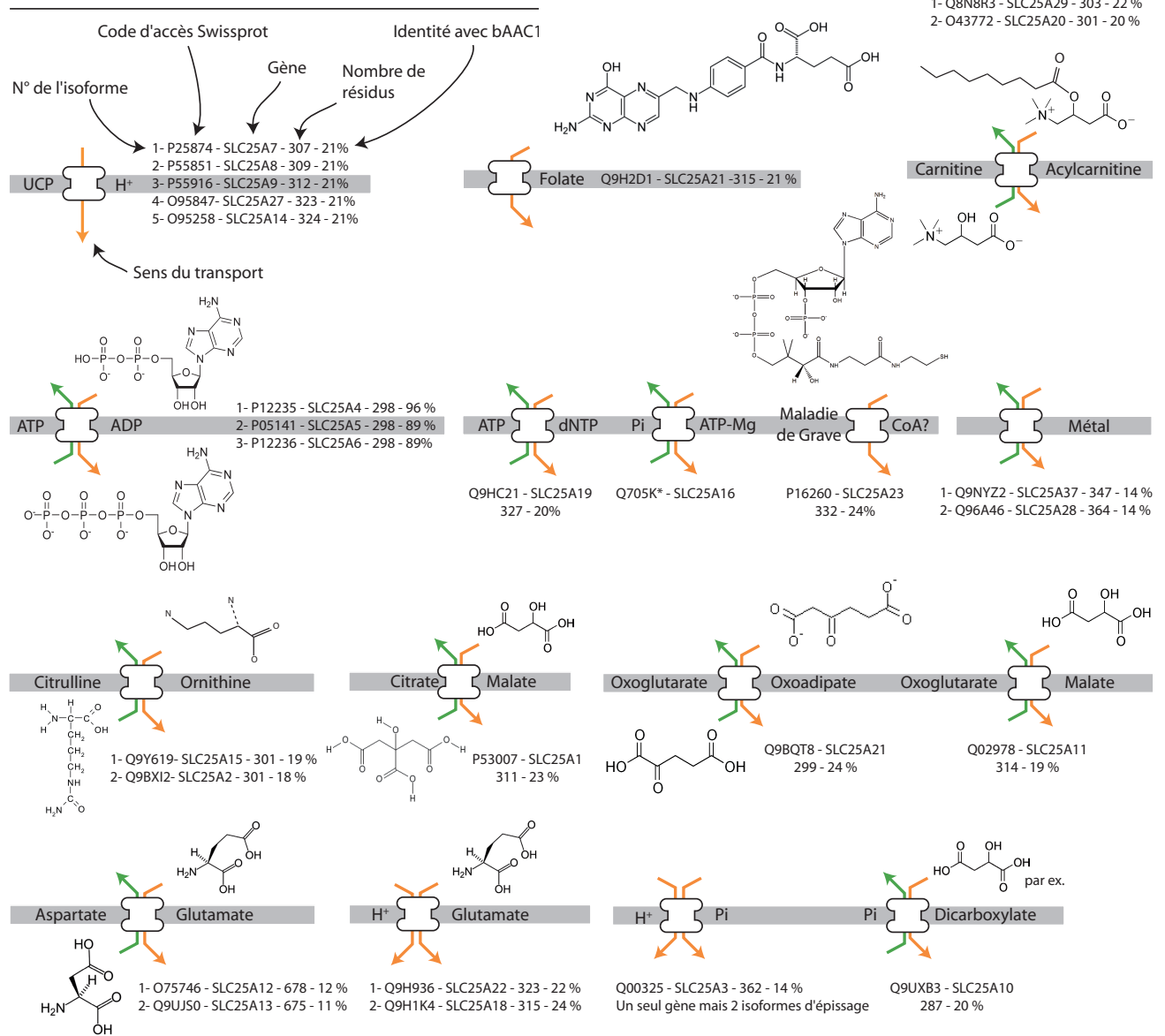


FIG. 1.3 – **Les transporteurs mitochondriaux humains.** Cette figure donne le nom, le code d'accès, les substrats transportés par les principaux membres de la MCF chez l'homme. Le nombre de résidus et le pourcentage d'identité avec le transporteur bovin d'ADP et d'ATP bAAC1 sont également indiqués. Pour une liste exhaustive des transporteurs humains, voir Palmieri [2004], Haitina et al. [2006]. Abréviations : Pi phosphate inorganique, Mg magnésium, dNTP déoxynucléotide, H⁺ proton et CoA coenzyme A.

Topologie Les prévisions de structures secondaires attribuent 6 hélices trans-membranaires aux membres de la MCF (voir Saraste et Walker [1982] pour la première analyse d'hydrophobie¹), dont les extrémités N et C se placent dans l'espace inter-membranaire (voir aussi la page 78). La structure de bAAC1 permet de préciser cette topologie : les hélices sont inclinées, certaines sont coudées et il existe des petits segments hélicoïdaux côté matriciel (figure 1.8).

Signature On trouve dans chacune des trois parties homologues la séquence signature *PxD/ExxK/R* (20 à 30 résidus) *D/EGxxxxaK/RG* où *a* représente un résidu aromatique. Cette séquence consensus peut présenter des variations d'un transporteur à l'autre, et pour une même protéine entre ses trois sous-parties. En conséquence certains auteurs affinent encore cette signature [Palmieri, 2004] ou la limitent aux six premiers acides aminés.

Biochimie Les transporteurs mitochondriaux possèdent une masse apparente d'environ 30 kDa, un point isoélectrique élevé, et la caractéristique inhabituelle de ne pas être retenus sur une résine d'hydroxylapatite dans certaines conditions de purification.

Oligométrie Une abondante littérature propose une organisation homodimérique des membres de la MCF ; elle sera discutée plus avant dans le chapitre deux consacré à l'oligométrie.

Origine et répartition Si l'on trouve des transporteurs mitochondriaux chez tous les organismes pourvus de mitochondries (truisme), on dénombre également quelques transporteurs de cette famille localisés dans d'autres organites : peroxisome de levure [Palmieri et al., 2001], chloroplastes des plantes, par exemple dans les membranes des thylakoïdes [Thuswaldner et al., 2007] et dans la membrane interne des chloroplastes d'*Arabidopsis Thaliana* [Palmieri et al., 2006]. Récemment un transporteur de déoxynucléotides a été identifié pour la première fois hors du règne eucaryote, dans le génome du mimivirus [Monné et al., 2007].

On ne trouve pas trace dans les banques de génomes, ni de membres de la MCF chez les organismes procaryotes, ni d'une séquence codant pour un tiers de transporteur MCF qui serait l'aïeul des transporteurs actuels.

1.2.2 Insertion dans la membrane interne

Une large majorité –autour de 98%– des protéines mitochondriales sont codées par des gènes nucléaires. Leurs chaînes polypeptidiques sont synthétisées dans le cytosol sous forme de pré-protéines associées à des chaperonnes, puis dirigées vers la mitochondrie où elles sont prises en charge par une machinerie d'import.

Selon le type et le compartiment de destination des protéines, il existe plusieurs mécanismes d'import, qui impliquent des protéines de la famille TIM et

¹Il est intéressant de noter la faible hydrophobie de l'hélice **H2**

TOM, respectivement *translocase of the inner/outer mitochondrial membrane* (pour revue consulter Neupert et Herrmann [2007]). De nombreuses protéines mitochondriales portent une séquence d'adressage N-terminale bien caractérisée qui permet leur translocation vers la matrice [Gakh et al., 2002].

La plupart des transporteurs mitochondriaux sont dénués d'une telle séquence ; l'information d'adressage est contenue dans la séquence de la protéine mature. Il semble que chacune des trois répétitions contribue à cet adressage au niveau de la membrane externe et de l'espace inter-membranaire –via des résidus proches des domaines transmembranaires–, alors que la seule information contenue dans la troisième répétition suffit à l'insertion dans la membrane interne [Endres et al., 1999, Brandner et al., 2005].

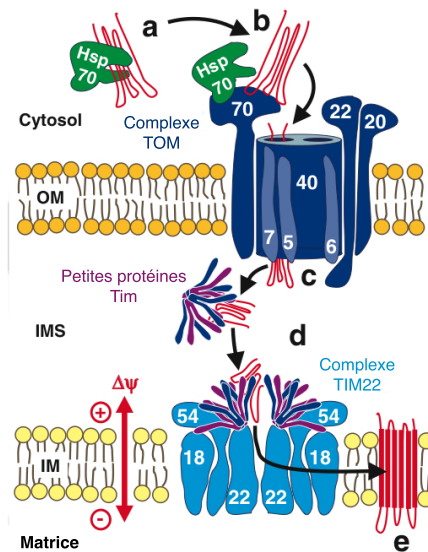


FIG. 1.4 – **Import des transporteurs mitochondriaux.** Les différentes étapes de la translocation par les complexes TOM et TIM22 sont schématisées. La description de chaque étape est dans le texte. D'après Neupert et Herrmann [2007].

Le mécanisme d'import des transporteurs mitochondriaux peut se découper en cinq étapes successives (figure 1.2.2). (a) La pré-protéine associée aux chaperonnes Hsp70 et Hsp90, non repliée, est acheminée vers la mitochondrie et (b) présentée au complexe TOM. (c) Elle franchit la membrane externe en présence d'ATP à travers le pore Tom40. (d) De petites protéines Tim9-10 de l'espace intermembranaire, organisées en un hexamère ressemblant à l'hélice d'un ventilateur, prennent en charge le précurseur protéique et le dirigent vers le complexe formé autour de Tim22. Il est possible que les 6 « bras » de l'hélice viennent cacher et protéger les parties hydrophobes du précurseur [Webb et al., 2006]. Ces protéines Tim9-10 portent une double signature CxxxC et leur état d'oxydation apparaît important. (e) Un complexe protéique de la membrane interne de 300 kDa, dont la sous-unité la plus importante Tim22 est entourée des sous-unités membranaires Tim18, Tim54 et solubles Tim9, Tim10, Tim12, insère enfin la pré-protéine dans la membrane interne. Cette étape nécessite l'existence d'un potentiel de membrane.

Les travaux de Dyllal et al. [2003] proposent que la dimérisation des transporteurs MCF ait lieu rapidement après leur insertion et s'accompagne de réarrangements structuraux.

Il est intéressant de souligner la relation entre translocation des transporteurs mitochondriaux et mise en place de leur topologie. Ainsi le complexe TIM n'insère dans la membrane interne que des protéines possédant un nombre pair d'hélices et dont les N- et C-termini sont situés dans l'espace intermembranaire. Et c'est au début de la translocation par TOM que les précurseurs acquièrent une topologie intermédiaire où les N- et C-termini restent exposés au cytosol.

1.3 Le transporteur d'ADP et d'ATP

1.3.1 Une protéine importante, abondante, largement étudiée

Le transporteur d'ADP et d'ATP (AAC pour *ADP-ATP carrier*) est le mieux connu parmi les transporteurs mitochondriaux ; une abondante littérature s'attache à son étude depuis les années 1970 (voir la chronologie du tableau 1.1). Deux facteurs au moins ont concouru à l'intérêt porté à cette protéine : son abondance naturelle dans certains organes et la découverte d'inhibiteurs spécifiques.

1955	Siekevitz et Potter [1955] établissent l'existence de deux lots de nucléotides adényliques, l'un cytosolique et l'autre matriciel.
1958	Pressman [1958] montre un échange extrêmement dynamique entre ces deux lots.
1962	Bruni et al. [1962] d'une part, Vignais et al. [1962] d'autre part, montrent que l'ATR inhibe spécifiquement la phosphorylation de l'ADP extra-mitochondrial.
1965	Découverte de la protéine liant l'ATR [Duee et Vignais, 1965] [Pfaff et al., 1965].
1978	Identification de la protéine liant les atractylosides au transporteur d'ADP et d'ATP [Klingenberg et al., 1978].
1982	La séquence de l'AAC1 de cœur de bœuf est disponible [Aquila et al., 1982].
1992	Identification de la famille MCF [Walker et Runswick, 1993].
2003	La structure atomique du complexe bAAC1-CATR [Pebay-Peyroula et al., 2003], ainsi que la carte en projection à moyenne résolution de scAAC2-ATR [Kunji et Harding, 2003] sont disponibles.

TAB. 1.1 – Quelques étapes marquantes de l'étude du transporteur d'ADP et d'ATP.

1.3.1.1 Caractéristiques et spécificité du transport

Chaque jour un être humain recycle sa propre masse d'ATP, alors que le stock en nucléotides adényliques ne dépasse pas cent grammes. Cette disproportion souligne l'efficacité de la régénération de l'ATP et celle de son transport. L'activité moyenne de transport mesurée sur des mitochondries de foie de rat est de l'ordre de 1000 min^{-1} (le nombre d'unités de transport est évalué grâce à la fixation du CATR) [Vignais, 1976, Klingenberg, 1980]². Cette faible activité est compensée par l'abondance de la protéine qui représente jusqu'à 15% des protéines de la membrane interne.

L'AAC permet *in vivo* l'export de l'ATP⁴⁻ depuis la matrice et l'import de l'ADP³⁻ présent dans l'espace inter-membranaire. Ce transport est électrogénique ; il dissipe le potentiel de membrane. Jusqu'à un tiers de l'énergie produite par la chaîne respiratoire peut être consommée par ce transport [Duszynski et al., 1981].

En système reconstitué, en l'absence de potentiel de membrane, le transport n'est plus directionnel. Des expériences contradictoires rapportent la possibilité de transport d'un seul nucléotide [Broustovetsky et al., 1997] ou au contraire la nécessité d'un échange un pour un des deux substrats (Brandolin et al. [1980], voir aussi la figure page 34). Bien sûr, *in vivo* il est obligatoire que l'échange constaté ait une stœchiométrie moyenne 1 :1 [Duce et Vignais, 1965].

L'AAC ne reconnaît aucun nucléotide pyrimidique. Des études de photomarquage avec des nucléotides modifiés ont mis en évidence deux étapes lors du transport : la fixation puis le passage du substrat. Cette seconde étape est plus sélective, et certains composés peuvent se fixer à l'AAC sans être transportés. Citons par exemple : le 8-azido ADP, le 2-azido ADP, l'AMP, l'éosine Y (qui se fixe côté matriciel [Majima et al., 1998]). Pour que cette fixation puisse être suivie d'un transport, il est nécessaire que le nucléotide adénylique possède une conformation *syn* non bloquée, ne soit pas substitué en position C₂ de la base, possède une amine en C₆ et plus d'un groupement anionique (figure 1.5).

En plus de l'ADP et l'ATP sont transportés par exemple la tubercidine diphosphates ou le 1-N-oxide ADP. Seules les formes non ligandées des nucléotides sont reconnues, et la présence d'ions magnésium interdit le transport en système reconstitué [Brandolin et al., 1981]. Le GDP n'est pas reconnu.

Le site de liaison de l'ADP est inconnu, néanmoins des études de photomarquage ont permis d'identifier côté cytosolique les segments F153–M200, Y250–M281 [Dalbon et al., 1988] du bœuf, G172–M210 [Mayinger et al., 1989] ou plus restrictif S183–R191 [Dianoux et al., 2000] de la levure ainsi qu'un segment additionnel placé près du C-ter : I311–K318. La structure atomique de bAAC1 en complexe avec le carboxyatractyloside présente une cavité, ouverte vers l'espace intermembranaire, à la surface de laquelle certains résidus pour-

²Ici il est intéressant de noter que les expériences d'électrophysiologie permettent d'évaluer la constante de temps du transport à 6 ms environ, ce qui correspond à une activité de l'ordre de $10\,000 \text{ min}^{-1}$ [Gropp et al., 1999]. A-t-on alors une unité de transport qui n'est « active » qu'un dixième du temps, le reste se passant en attente, liaison et relargage des substrats ? ou encore une unité de transport active sur dix à un instant donné ? ou probablement une situation intermédiaire.

raient participer au transport (pour revue voir Pebay-Peyroula et Brandolin [2004], ces résidus apparaissent aussi sur la figure page 17). Des travaux de modélisation proposent l'intervention des résidus K22, R79, G182, I183 et R279 dans le site de liaison chez le bœuf [Kunji et Robinson, 2006]

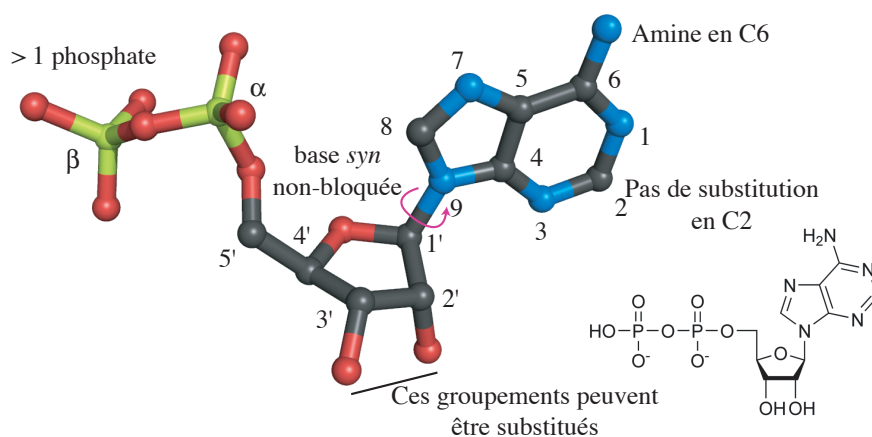


FIG. 1.5 – **Molécule d'ADP et conditions de transport.** La figure présente une représentation à plat et en trois dimensions de la molécule d'ADP, avec sa nomenclature et les restrictions portant sur les nucléotides transportés par l'AAC.

1.3.1.2 Inhibiteurs : atractylosides et acides bongkréiques

Deux groupes distincts d'inhibiteurs de l'AAC existent. Ils ont en commun une grande spécificité et une haute affinité.

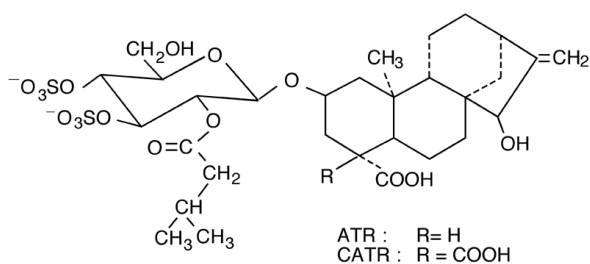
Le premier comprend l'atractyloside (ATR) et le carboxy-atractyloside (CATR). On extrait ces composés de plantes, notamment d'*Atractylis gummifera* (figure 1.6), un chardon du bassin méditerranéen également connu en France sous le nom de chardon à glu. Ses vertus médicinales et toxiques sont connues depuis l'antiquité : Theophrastus décrit la plante et suggère son usage comme vermifuge, comme poison contre les chiens, mais également dans le traitement de la lèpre en application externe [Daniele et al., 2005]. Une grande diversité d'emploi d'*Atractylis gummifera* se retrouve dans la médecine traditionnelle, du traitement des parasites intestinaux à l'interruption de grossesse en passant par le blanchiment des dents. Les cas d'empoisonnement aux atractylosides sont rares (une centaine rapportés depuis le dix-neuvième siècle) mais souvent fatals. Ils sont accompagnés de symptômes tels que nausées, vomissements et douleurs abdominales, généralement suivis d'un coma. L'inhibition de l'échange d'ADP et d'ATP par les atractylosides entraîne notamment la nécrose hépatique.

Le CATR et l'ATR sont des inhibiteurs qui ne traversent pas la membrane interne ; ils se fixent sur la partie exposée au solvant de l'AAC dans l'espace intermembranaire. L'ATR est un inhibiteur compétitif vis-à-vis de la fixation des nucléotides dont la constante de dissociation est de l'ordre de 100 nanomolaires ;

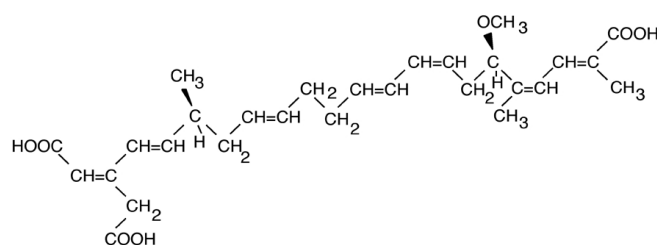
le CATR est un inhibiteur non-compétitif dont la constante de dissociation est de l'ordre de 10 nanomolaires.

Structure et liaison à l'AAC Les atractylosides se composent d'un noyau diterpène, ainsi que d'un glucose disulfaté et portant un résidu isovalérique. Une liaison glycosidique attache le sucre à l'atractylgénine (figure 1.6). Le CATR possède un groupement carboxyle supplémentaire en position 4 de ce dernier, qui le différencie de l'ATR.

Formule chimique du (C)ATR



Formule chimique du BA



Le chardon *Atractylis gummifera*



Préparation de tempeh



FIG. 1.6 – **Les inhibiteurs de l'AAC.** A gauche les atractylosides, la photo représente le chardon *Atractylis gummifera*. A droite l'acide bongkrékique, la photo représente une préparation de *tempeh*.

La structure de l'AAC bovine complexée au CATR [Pebay-Peyroula et al., 2003] permet de détailler les interactions entre la protéine et l'inhibiteur. Son noyau diterpène est orienté vers le fond de la cavité et ses groupements sulfates pointent vers l'espace intermembranaire; il est décalé par rapport à l'axe de pseudo-symétrie et interagit plutôt avec les hélices **H2** à **H5**. Tous les groupements chimiques du CATR sont impliqués dans des interactions avec la protéine à l'exception de l'alcool primaire en C_{6'} du cycle glucose. Les sulfates, les carboxylates et l'hydroxyl du diterpène établissent des interactions électrostatiques

ou des liaisons hydrogènes, parfois via une molécule d'eau, avec la cavité, tandis que le cycle diterpène et le résidu isovalérique sont en interaction de van der Waals avec la protéine.

Le groupement carboxyle supplémentaire du CATR interagit avec l'arginine R279 via une molécule d'eau. Cette liaison hydrogène explique la différence d'affinité entre le CATR et l'ATR (elle est d'un ordre de grandeur).

Les acides bongkréiques L'AAC peut également être inhibé par l'acide bongkréique (BA) et isobongkréique; ce toxique naturel est sécrété par la bactérie *Pseudomonas cocovenenans* qui se développe sur la pulpe de noix de coco. Les cas d'empoisonnement proviennent de l'ingestion de *tempeh*, une préparation culinaire indonésienne obtenue par fermentation de la noix de coco, à présent interdite à la vente.

Le BA est un inhibiteur non compétitif, capable de traverser la membrane interne, qui se fixe sur la protéine du côté matriciel. Son site de liaison n'est pas connu, et la nature lipophile de ce composé pose de nombreux problèmes pour l'étude du complexe AAC-BA, notamment celui de la distinction entre l'inhibiteur lié et celui simplement associé aux micelles. La constante de dissociation du complexe est de l'ordre de 10 nanomolaires.

Les acides bongkréiques sont des dérivés d'acides gras à longue chaîne polyinsaturée (figure 1.6).

1.3.1.3 Inhibiteurs et conformations

Les protéines de transport adoptent des conformations différentes lors des différentes étapes de leur fonctionnement. Dans le cas de l'AAC, les conformations inhibées par le CATR et le BA sont traditionnellement décrites comme les conformations « extêmes » adoptées par la protéine lors du transport. Des mesures de fluorescence intrinsèque montrent en effet que ces états présentent une fluorescence faible et forte respectivement (pour revue voir Brandolin et al. [1993]). De plus la fixation du CATR et du BA sont mutuellement exclusives (à noter qu'on peut remplacer le BA par du CATR mais non l'inverse). Tous deux ont la capacité de déplacer partiellement le naphthoyl-ADP fixé à la protéine [Block et al., 1982], et ce déplacement devient total s'il y a suffisamment de nucléotides en solution pour favoriser l'interconversion.

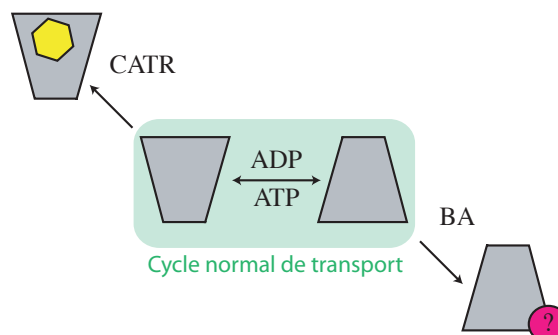


FIG. 1.7 – **Inhibiteurs et conformations.** Parmi l'ensemble des conformations adoptées par l'AAC certaines permettent la liaison du CATR ou du BA qui bloquent alors une conformation « extrême ».

La conformation CATR correspondrait plutôt à l'état où le transporteur accepte un ADP venant de l'espace inter-membranaire ; la conformation BA à l'opposé celui où un ATP se fixe depuis la matrice.

1.3.1.4 Isoformes

Quatre isoformes du transporteur d'ADP et d'ATP ont été identifiées jusqu'à présent chez l'homme, trois chez le bœuf, deux chez les rongeurs. Chez les plantes, deux isoformes sont caractérisées chez *Arabidopsis thaliana*. On connaît trois isoformes chez la levure ; la seconde est celle majoritairement exprimée en condition aérobie. Son interruption suffit à empêcher la croissance de la levure sur une source de carbone non-fermentescible [Drgon et al., 1991].

Taux d'expression et répartition tissulaire Chez l'homme ou le bœuf, le niveau d'expression de chaque isoforme dépend du tissu cellulaire et du stade de développement [Stepien et al., 1992, Skarka et al., 2003]. hAAC1 (ou son homologue bovine) est l'isoforme dominante dans les muscles cardiaque et squelettiques [Doerner et al., 1997, Powell et al., 1989] ; hAAC2 est faiblement exprimé dans tous les tissus, et cette expression dépend de l'activité respiratoire [Yamazaki et al., 2002] ; hAAC3 est faiblement exprimé dans les cellules à capacité régénératrice et fortement exprimé dans les cellules cancéreuses [Li et al., 1989, Powell et al., 1989] ; hAAC4 est exprimé dans le foie, les testicules et le cerveau [Dolce et al., 2005].

Points communs et différences dans la séquence d'acides aminés Les protéines de levure possèdent des résidus supplémentaires en N-ter notamment. L'homologie est souvent plus forte pour une isoforme donnée entre organismes différents qu'entre isoformes du même organisme. Tous les AAC portent une séquence signature placée dans le troisième tiers, et composée des six acides aminés *RRRMMM*.

1.3.1.5 Pathologies associées

Le phénotype de souris *knock-out* montre l'importance physiologique du transporteur d'ADP et d'ATP. Des lignées transgéniques, dont les gènes codant pour mAAC1 ou mAAC2 ont été inactivés, donnent en effet des animaux viables présentant une hypertrophie cardiaque et une désorganisation des fibres musculaires pour mAAC1 [Graham et al., 1997] tandis que l'inactivation de mAAC2 est létale avant la naissance [Kokoszka et al., 2001].

Une déficience en AAC chez l'homme est à l'origine de myopathies [Bakker et al., 1993, Jordens et al., 2002] qui ne résultent pas d'une modification du gène mais d'une transcription défectueuse ou d'un import altéré. Une modification de l'expression des isoformes 1 et 3 est associée à des myopathies cardiaques [Schultheiss et Bolte, 1985, Dorner et al., 2006].

Cinq mutations ponctuelles ont été caractérisées chez des patients souffrant d'ophtalmoplégies. Ces mutations sont A89D, L98P, D104G, A114P et V289M dans hAAC1 [Deschauer et al., 2005, Kaukonen et al., 2000, Komaki et al., 2002, Napoli et al., 2001, Siciliano et al., 2003]. L'étude de ces mutations chez la levure montre une incapacité des protéines mutantes à restaurer la croissance de souches dépourvues de scAAC2 [De Marcos Lousa et al., 2002, Fontanesi et al., 2004]. La position des résidus correspondants dans la structure du complexe bAAC1-CATR ne permet pas d'expliquer simplement l'origine de leur pathogénie.

La forte expression de hAAC3 dans les cellules tumorales a été proposée comme propice au maintien d'un potentiel membranaire malgré l'activité surtout glycolytique de ce type de cellules [Chevrollier et al., 2005].

1.3.2 Aspects structuraux

La structure du complexe bAAC1-CATR [Pebay-Peyroula et al., 2003], obtenue au laboratoire en 2003 en collaboration avec l'équipe de Gérard Brandolin, est décrite brièvement ici (figure 1.8). Plusieurs revues détaillent ses caractéristiques [Pebay-Peyroula et Brandolin, 2004, Nury et al., 2006]. Certains aspects en sont également abordés à partir de la page 87 – notamment les lipides structuraux dont l'identification et la position ont été améliorées grâce à une nouvelle forme cristalline présentée dans ce manuscrit.

La protéine est formée de six hélices transmembranaires, toutes inclinées par rapport à la normale à la membrane, et coudées pour les hélices impaires au niveau de résidus prolines de la séquence signature. Ces hélices définissent grossièrement un cylindre plein du côté matriciel et évidé d'une cavité tronconique profonde (d'environ 20 Å de diamètre et 30 Å de profondeur) du côté de l'espace intermembranaire. De courtes boucles relient les hélices dans l'espace intermembranaire, alors que les boucles matricielles, plus longues, comportent des segments en hélices α .

La triplification est fortement reflétée par la structure, les chaînes principales des sous-parties se superposent avec des RMSD d'environ 2 Å et s'organisent autour d'un axe de pseudo-symétrie d'ordre trois.

Des densités adjacentes dans le modèle moléculaire électronique correspondent d'une part à des molécules de lipides ou de détergent accolées à la surface latérale de la protéine, d'autre part à l'inhibiteur CATR, fortement lié dans la cavité (voir à ce propos la figure 5 de Pebay-Peyroula et al. [2003]).

Outre une connaissance factuelle précieuse, l'analyse de la structure permet d'établir deux grandes hypothèses quant au fonctionnement de la protéine.

D'abord la cavité s'organise pour attirer, sélectionner et lier les substrats. Un ensemble de zones de résidus exposés basiques ainsi qu'une échelle de trois tyrosines que poursuit une phénylalanine permettrait la progression de l'ADP vers le fond de la cavité. Un filtre composé des résidus conservés K22, R79, Y186 et R279 assurerait la sélectivité au niveau de l'étranglement de la cavité.

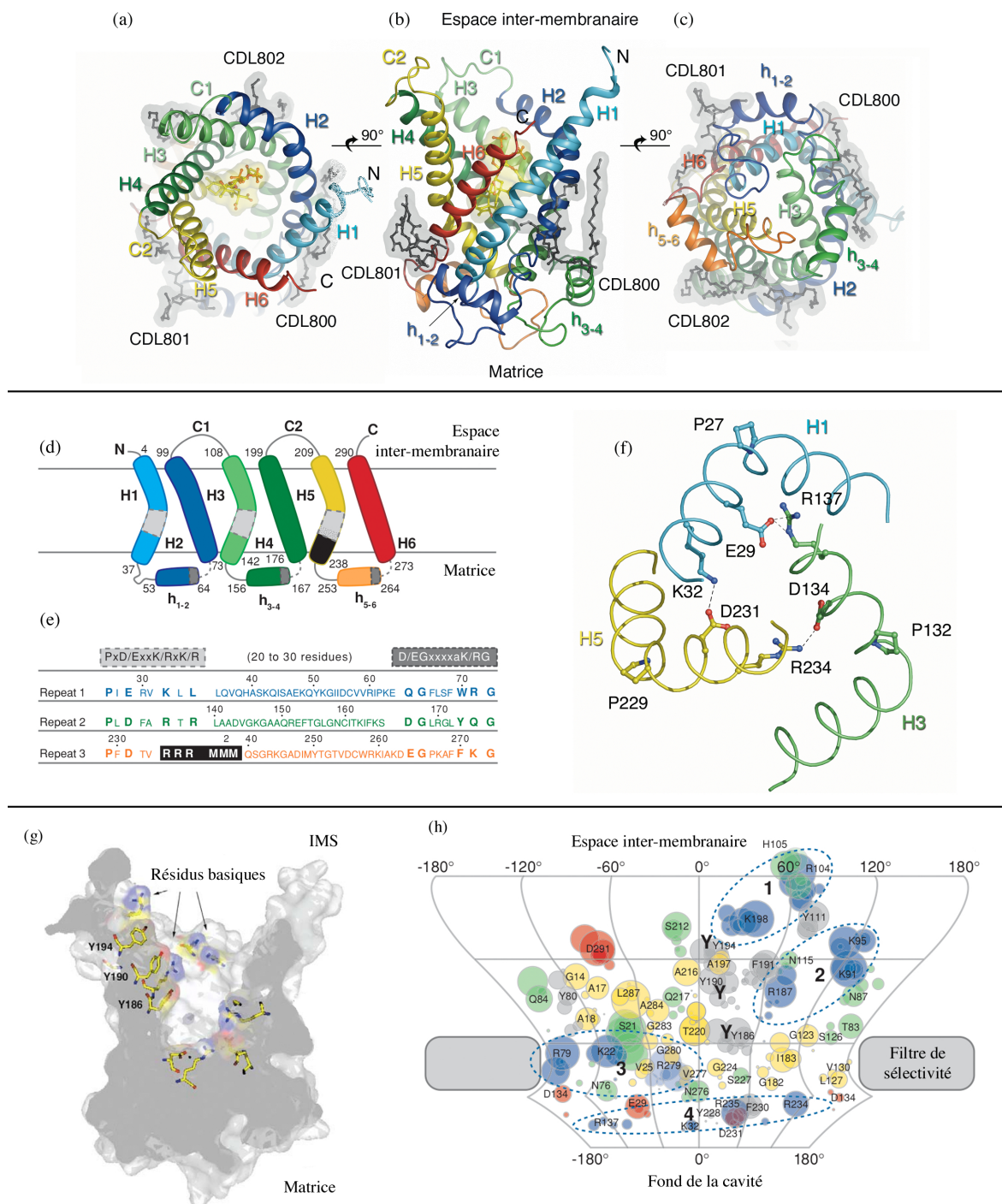


FIG. 1.8 – La structure cristallographique du complexe bAAC1-CATR. Vue générale du complexe dans le plan de la membrane (b), depuis l'espace intermembranaire (a) et la matrice (c). Topologie (d) et emplacement de la séquence signature dans les trois domaines homologues (e). Le panneau (f) représente les acides aminés de la signature MCF qui assurent la fermeture des hélices impaires. Une vue en coupe (g) et dépliée (h) de la cavité permet de visualiser les zones de résidus positifs ainsi que l'échelle de tyrosines qui y sont exposées.

Ensuite, les hélices impaires forment entre elles un réseau de ponts salins maintenant une conformation fermée et empêchant le passage des substrats. Ces ponts salins font intervenir les résidus acides et basiques de la signature de la famille MCF, dont l'appariement est possible grâce aux coudes des hélices impaires. Ces coudes sont favorisés par les prolines de cette même signature. La perturbation de ces ponts par la liaison du substrat pourrait permettre un mouvement des hélices autour des charnières prolines, concomittant au passage du métabolite.

Les six résidus *RRRMMM* placés dans le troisième motif sont la séquence signature des transporteurs d'ADP et d'ATP. La figure 1.9 montre leur emplacement dans la structure.

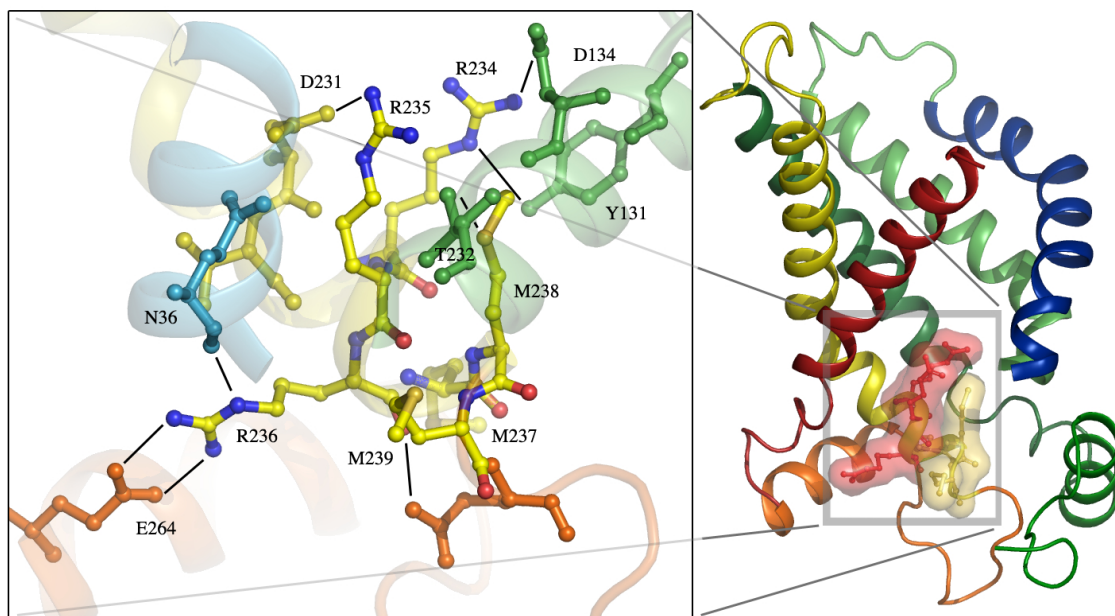


FIG. 1.9 – **Position de la séquence signature des transporteurs d'ADP et d'ATP.** A droite une vue générale de la protéine dans le plan de la membrane (même orientation que 1.8.b), les hélices **H1** et **H2** sont en partie cachées pour permettre de voir la région de la signature. Les résidus RRR sont en bâtons et volume rouges, les résidus MMM en jaune. A gauche la zone de la séquence signature est agrandie et les principales interactions avec les résidus voisins sont indiquées. Le code couleur est toujours le même tout au long du manuscrit pour permettre de repérer à quelle hélice appartient un résidu.

1.4 Apoptose et mitochondrie

1.4.1 La mort cellulaire programmée

Les cellules d'un organisme pluricellulaire vivent et meurent. Suivant le type d'événements à l'origine de la mort cellulaire, la morphologie associée³ et le mécanisme moléculaire qui la sous-tend, on peut distinguer plusieurs types de mort. L'autophagie ou l'oncose en sont deux exemples, mais les deux types les plus courants sont la nécrose et l'apoptose. L'apoptose est une mort cellulaire génétiquement programmée et contrôlée, on parle souvent à son propos de suicide cellulaire pour l'opposer à la nécrose, mort cellulaire passive à la suite d'une rupture de l'intégrité membranaire. Néanmoins nécrose et apoptose existent sous de multiples formes, et un continuum de mort cellulaire relie en fait ces deux processus.

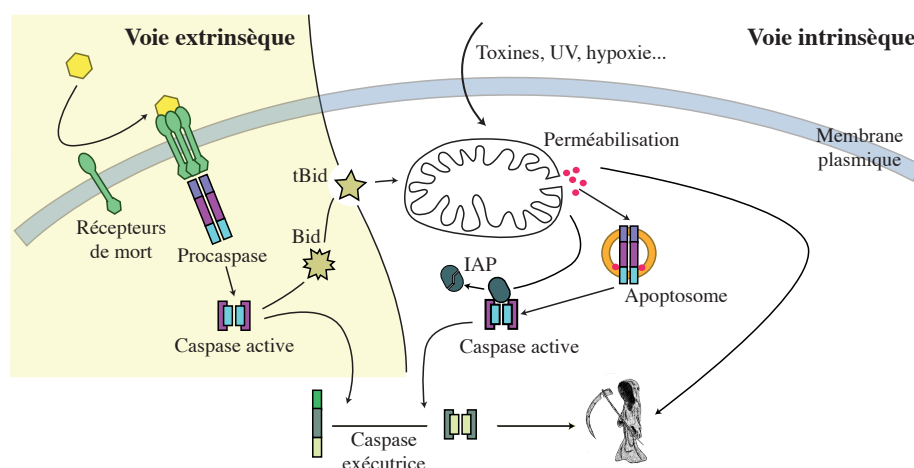


FIG. 1.10 – **Déclenchement de l'apoptose.** La perméabilisation de la mitochondrie permet le relargage dans le cytosol des protéines apoptogènes : le cytochrome C, l'AIF (acronyme de *Apoptosis Inducing Factor*), l'endonucléase G, HtrA2/Omi, Smac/Diablo et les procaspases 2, 3, 7 et 9. HtrA2/Omi et Smac/Diablo permettent l'inhibition de protéines IAP, constitutivement exprimées, qui bloquent les caspases. Le cytochrome C participe à l'activation de la caspase-9 au sein du complexe protéique appelé apoptosome. Celle-ci conduit à l'activation des caspases exécutrices. En parallèle peut se produire un mécanisme d'activation de l'apoptose indépendant des caspases qui cause la dégradation de l'ADN nucléaire. Le passage de la voie intrinsèque à la voie extrinsèque peut se faire grâce à la protéine Bid/tBid qui provoque la perméabilisation.

³Le noyau des cellules apoptotiques présente notamment une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN en segments de deux cents paires de bases environ.

L'apoptose est généralement découpée en trois phases : une phase d'initiation au cours de laquelle les stimuli apoptotiques sont reçus par la cellule ; une phase de décision qui conduit les centres intégrateurs de ces stimuli à rentrer ou non dans la phase de dégradation qui aboutit à la destruction des composants cellulaires.

A ces trois phases s'adjoignent deux voies de déclenchement : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (figure 1.10). C'est cette dernière qui nous intéresse car elle fait intervenir la mitochondrie. En réponse à une large variété de stimuli, la mitochondrie va se perméabiliser et libérer dans le cytosol des protéines apoptogènes. Cette libération signale l'entrée dans la phase de dégradation.

1.4.2 Quelle perméabilisation et comment advient-elle ?

Le gonflement des mitochondries isolées dans un milieu comportant des ions calcium est rapporté depuis les premiers travaux sur l'organite. Ce gonflement s'accompagne d'une chute du potentiel de membrane et conduit à la libération de protéines matricielles. La liaison entre cette transition de perméabilité et l'apoptose est, par contre, plus récente.

Il existe différents modèles mais pas de consensus quant à la manière dont advient la perméabilisation mitochondriale. Le premier s'appuie sur les propriétés d'insertion dans les membranes des oligomères de protéines de la famille Bcl-2 ; le second décrit l'ouverture d'un pore protéolipidique grâce à Bax ou tBid ; le troisième fait intervenir les protéines de fusion et de fission de la mitochondrie ; enfin le quatrième comporte comme élément central un complexe multi-protéique appelé pore de transition de perméabilité (PTP) (caractérisation par électrophysiologie : voir Bernardi et Petronilli [1996]). Il se différencie des autres modèles par la perméabilisation concomitante des deux enveloppes mitochondriales.

La composition moléculaire du PTP Un grand nombre de protéines ont été décrites comme intervenant dans le PTP à proprement parler, ou dans sa régulation (voir le tableau 1.2). L'accumulation de données contradictoires doit conduire à une grande prudence lorsqu'il s'agit de nommer les entités moléculaires qui composent ce pore.

Implication de l'AAC C'est à la fois la capacité de l'AAC à former un pore en présence d'ions calcium, et la modulation du PTP par les inhibiteurs de l'AAC qui ont conduit à impliquer cette protéine, parfois avec un rôle central, dans la perméabilisation mitochondriale.

Néanmoins le cadre de cette implication demeure flou. Des interactions physiques et fonctionnelles entre l'AAC et Bax [Marzo et al., 1998], la cyclophiline D, Vpr [Jacotot et al., 2001], etc... sont décrites. Pourtant l'AAC seule peut former un pore sensible au BA mais pas au CATR [Brustovetsky et al., 2002] caractérisé en électrophysiologie. De plus la transition de perméabilité peut intervenir en absence d'AAC [Kokoszka et al., 2004] chez des souris transgéniques.

Protéine	Localisation	Réf. pour	Réf. contre
AAC	IM	[Haworth et Hunter, 2000] [Halestrap et Brennerb, 2003]	[Kokoszka et al., 2004]
VDAC Porine mitochondriale	OM	[Le-Quoc et Le-Quoc, 1985]	[Krauskopf et al., 2006]
CycloD Cyclophiline D	M	[Schinzel et al., 2005]	[Basso et al., 2005]
PBR <i>Récepteur périphérique au benzodiazépane</i>	OM	[Azarashvili et al., 2006]	
CK <i>Créatine Kinase</i>	IM	[Dolder et al., 2003]	
HK <i>Hexokinase</i>	C	[Azoulay-Zohar et al., 2004]	

TAB. 1.2 – **Les protéines potentiellement impliquées dans le PTP.** Abréviations : IM membrane interne, OM membrane externe, M matrice, C cytosol et IMS espace intermembranaire. Les protéines en italique seraient des régulateurs du PTP et ne participeraient pas au pore.

Nous avons utilisé deux partenaires potentiels de l'AAC (la cyclophiline D et Vpr) au sein d'un hypothétique pore mitochondrial à des fins de purification. Ces travaux font l'objet du chapitre trois et les différentes interactions entre protéines y sont détaillées.

Chapitre 2

Etat oligomérique

Une abondante littérature présente des arguments en faveur d'une organisation dimérique du transporteur d'ADP et d'ATP, et même de l'ensemble des transporteurs mitochondriaux. « Trente années de biochimie » convergent dans cette direction.

Pourtant, l'assemblage oligomérique de l'AAC et des autres membres de la famille continue d'être l'objet d'un débat scientifique, ravivé par les informations structurales disponibles depuis 2003. En effet, la structure du complexe bAAC1-CATR ne permet ni de valider, ni d'infirmer l'existence d'un dimère fonctionnel. Elle n'est pas incompatible avec une unité de transport monomérique.

Nous montrons que ce complexe est monomérique lors des étapes finales de sa purification, et décrivons les interfaces acceptables entre protéines dans les cristaux qui impliquent des cardiolipides. L'oligomérisation *in vivo* demeure inconnue.

2.1 Un tour d'horizon de la littérature

2.1.1 Pourquoi certaines protéines s'organisent-elles en oligomères ?

De très nombreux processus biologiques se rapportent *in fine* à des interactions. Celle d'une enzyme et d'un substrat, celle d'un récepteur avec son ligand, mais également des interactions entre protéines, par exemple dans les voies de signalisation. Les projets actuels de cartographie des interactions protéiques à l'échelle d'une cellule [Rual et al., 2005], limités principalement aux protéines solubles, reflètent l'intérêt de la communauté scientifique à décrire et comprendre ces phénomènes. « L'interactomique » est un néologisme plus récent que ses grands frères « génomique » et « protéomique », signe peut-être de la difficulté de mise en évidence expérimentale¹ des interactions protéine-protéine.

¹Non pas tellement que les complexes multi-protéiques soient difficiles à identifier, mais plutôt qu'il est difficile de s'assurer de leur réalité *in vivo* : difficile de discriminer les faux positifs des résultats pertinents.

Celles-ci ne reposent pas sur de solides liaisons covalentes, mais sur l'ensemble des liaisons faibles qui peuvent unir deux chaînes polypeptidiques : liaisons hydrogènes, ponts salins, interactions de van der Waals ou hydrophobes. Alors qu'il faut apporter 436 kJ pour briser la liaison covalente de la molécule de dihydrogène, vingt fois moins d'énergie suffisent pour rompre une liaison hydrogène. On comprend alors qu'il soit malaisé de mettre en évidence l'existence d'un oligomère. A l'inverse, il est également facile de décrire une interaction qui n'existe que dans des conditions expérimentales particulières, et dont la réalité *in vivo* est sujette à caution. Ce sera en partie l'objet du chapitre quatre qui décrit les expériences utilisant l'interaction de l'AAC avec la cyclophiline D ou Vpr.

Il convient aussi de garder à l'esprit la différence entre les complexes protéiques robustes –en général bien caractérisés ou caractérisables–, comme par exemple le ribosome, et les cas plus flous d'interactions transitoires et/ou non indispensables.

Nous nous intéressons ici à l'état oligomérique du transporteur d'ADP et d'ATP, plus précisément à son existence comme dimère ou comme monomère. La question de l'oligomérisation ne peut être dissociée de celle du mécanisme de transport. Si le dimère existe, a-t-on passage d'un ATP dans un monomère pendant que l'autre fraye un chemin à l'ADP ? Comment les deux monomères coordonnent-ils leurs actions ?

Il est intéressant de placer notre problème dans son contexte. On peut donc donner quelques exemples de protéines membranaires organisées en oligomères, et rapporter les débats contradictoires qui les concernent.

La dimérisation des GPCR : un rôle fonctionnel Les GPCR (acronyme de *G-protein coupled receptors*) forment une famille nombreuse de protéines impliquées dans la transmission du signal, d'une grande importance thérapeutique. Bien que les stimuli activateurs des GPCR soient divers, toutes partagent une topologie à sept hélices transmembranaires et un mécanisme commun de transmission du signal via la liaison avec un hétérotrimère de GTPases.

L'unique modèle atomique d'une structure de GPCR est celui de la rhodopsine bovine (code PDB : 1u19). Cette protéine abondante des membranes de disques de cellules rétinales s'organise en rangées denses de dimères dans les membranes natives observées par microscopie à force atomique [Fotiadis et al., 2003] ou microscopie électronique [Suda et al., 2004].

L'homo- et l'hétéro-dimérisation de diverses GPCR a récemment été l'objet de nombreuses recherches. Des expériences remettent en question un modèle monomérique de fonctionnement, défendu par des expériences d'isotropie d'orientation (vue avec la diffraction de neutrons) ou par la mesure de vitesses de diffusion. Parmi ces travaux, citons par exemple ceux sur l'hétéro-dimérisation du récepteur de GABA_B [Marshall et al., 1999, Galvez et al., 2001].

Il est intéressant de noter que les expériences portant sur l'oligomérisation des GPCR font appel à des techniques en partie différentes de celles utilisées pour

l'étude de la famille MCF, comme par exemple le transfert de fluorescence ou la microscopie à force atomique. La transactivation est un autre exemple de technique spécifique : il s'agit d'une expérience au cours de laquelle un dimère formé d'une unité incapable de recevoir le stimulus et d'une unité incapable de transmettre le signal se montre fonctionnel.

Le dimère de SecYEG : une plate-forme pour la liaison de SecA ?

Les protéines membranaires SecY, SecE et SecG forment une des machineries d'export bactériennes. Cet hétérotrimère [Yahr et Wickner, 2000] transporte des chaînes polypeptidiques non repliées portant une séquence signal à travers la membrane ; son fonctionnement dépend du potentiel membranaire. La structure cristalline d'un homologue d'archaebactérie SecYE β montre que le monomère peut former seul un canal de transport [Van den Berg et al., 2004]. Néanmoins, la cryomicroscopie [Breyton et al., 2002], les études de pontage [Tam et al., 2005], le FRET [Mori et al., 2003] montrent une organisation dimérique du complexe. La dimérisation serait nécessaire à l'ouverture du canal, fermé dans la structure atomique. Des mélanges de monomère et de tétramère sont vus en ultracentrifugation analytique [Collinson et al., 2001] ; la cryofracture identifie ces mêmes espèces ainsi que le dimère [Scheuring et al., 2005]. La concentration des protéines, comme celle des détergents utilisés pour les solubiliser, joue sur l'état oligomérique de SecYEG.

Le rôle fonctionnel de la dimérisation reste débattu ; il est notamment possible qu'elle soit nécessaire à l'interaction avec la protéine présentatrice SecA, qui conduit les préprotéines du ribosome jusqu'à la machine de translocation SecYEG.

Les tétramères d'aquaporine : quatre canaux côte-à-côte L'identification de l'entité moléculaire responsable du transport de l'eau à travers les membranes est plus tardive que celle du transporteur ADP-ATP. Elle intervient en 1988 dans le groupe de Agre [Denker et al., 1988], qui détermine dans la foulée l'état oligomérique de ce complexe. Les aquaporines sont organisées en tétramères, et chaque protéine possède un canal individuel. Ce tétramère est notamment détecté en ultracentrifugation analytique [Smith et Agre, 1991] et lors d'expériences de microscopie [Walz et al., 1994]. Dans le cas d'AqpZ de *E. coli*, le tétramère résiste même à 1% de SDS [Borgnia et al., 1999] ! Cependant l'organisation tétramérique ne porte pas de rôle fonctionnel.

Des complexes respiratoires très multimériques Une majorité des protéines de structure connue de la membrane mitochondriale appartient à la chaîne respiratoire (voir la figure 1.2 dans le premier chapitre), et leur organisation oligomérique est fascinante.

Le complexe I par exemple (NADH coenzyme Q oxydoreductase) comprend chez le boeuf quarante-six sous-unités dont sept codées par le génome mitochondrial, ainsi que de nombreux groupements prosthétiques. Même dans sa version

minimale bactérienne, le complexe comprend encore quatorze sous-unités, qui correspondent d'ailleurs à leurs homologues mitochondriales.

L'existence en tant qu'entité individuelle du complexe I est montré par la possibilité de l'isoler en détergent. La formation de supercomplexes entre les complexes I et III est actuellement l'objet d'un débat (pour revue voir Lenaz et al. [2006]).

La stœchiométrie variable des antennes de centres réactionnels photosynthétiques bactériens L'étude de membranes natives par microscopie à force atomique (voir par exemple Bahatyrova et al. [2004], Scheuring et al. [2004]) a permis de montrer une variabilité dans le nombre d'antennes LH2 associées aux centres réactionnels. Ces complexes photosynthétiques (centre réactionnels, antennes LH1 et LH2) permettent la collecte de la lumière et effectuent les premières étapes de la chaîne de transfert des électrons. Non loin de dimères de centres réactionnels entourés de LH1 et de PufX, les antennes LH2 s'organisent en couronnes de diamètre variable, regroupant le plus souvent entre huit et dix antennes pour la souche concernée (figure 2.1).

Il est également intéressant de noter que ces unités photosynthétiques sont placées dans des zones denses où la concentration protéique est très élevée ; des zones très éloignées de la représentation par une mosaïque fluide de la membrane – et en quelque sorte délipidées.

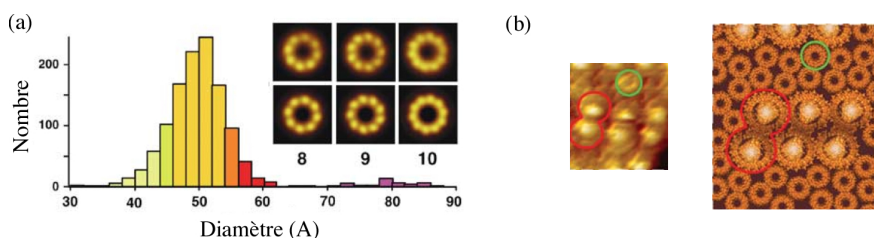


FIG. 2.1 – **Assemblages de complexes photosynthétiques.** (a) Distribution des tailles des couronnes de LH2, et reconstruction de complexes de taille proche de 50 Å chez *Rhodospirillum photometricum*, repris de Scheuring et al. [2004]. (b) Image AFM et reconstruction avec les modèles atomiques d'un complexe RC-LH1-PufX (rouge) et d'une couronne de LH2 (vert) de *Rhodobacter sphaeroides*, repris de Bahatyrova et al. [2004].

Un facteur de diversité Le nombre de familles de protéines membranaires est largement moindre que le nombre de familles de protéines solubles [Oberai et al., 2006]. De plus les protéines solubles possèdent fréquemment plusieurs domaines. C'est le cas d'environ 80% d'entre elles chez les eucaryotes. A l'inverse, seules 33% des protéines membranaires de ce même règne sont multi-domaines²

²Il est par ailleurs intéressant de noter que près de la moitié de ces protéines membranaires multi-domaines possèdent plusieurs répétitions de domaines identiques. Les duplications de

[Liu et al., 2004]. On décrit la combinaison de domaines au cours de l'évolution comme une stratégie visant à la diversité : à partir de nouveaux agencements naissent de nouvelles fonctions. Les protéines enchâssées dans une membrane ont une liberté de mouvement restreinte : elles ne peuvent diffuser qu'au sein de celle-ci, et leur orientation est fixe. En conséquence, la pénalité entropique associée à la formation de complexes protéiques non-covalents est réduite. On peut supposer que le mécanisme équivalent à la combinaison de domaines est chez les protéines membranaires la formation de complexes oligomériques.

A travers ces exemples se dessine un panorama d'une extraordinaire variété de l'organisation oligomérique des protéines membranaires. Les complexes moléculaires peuvent être : solides ou fragiles, fondamentaux ou contingents, transitoires, le fruit d'un assemblage minutieux, ou s'accomoder d'une stoechiométrie approximative ...

Mais revenons à présent à notre famille d'intérêt, les transporteurs mitochondriaux.

2.1.2 Assemblage oligomérique des transporteurs mitochondriaux

On peut distinguer au moins trois types d'expériences sur l'état oligomérique des transporteurs mitochondriaux. Le premier donne lieu à la détermination d'une **masse de particule** (la diffusion de neutrons, l'ultracentrifugation analytique, mais aussi l'électrophorèse native et la chromatographie d'exclusion de taille rentrent dans cette catégorie). Une masse proche du double de la masse moléculaire donnée par la séquence protéique est alors une indication de l'existence du dimère.

Les études de **stoechiométrie** (par exemple de la liaison d'un inhibiteur, d'un analogue de substrat, ou de l'échange ADP contre ATP) peuvent également renseigner sur l'état oligomérique et constituent le deuxième grand type d'expériences.

Enfin, le troisième type donne des informations de **proximité spatiale** entre protéines (par exemple les études de pontage chimique ou la construction de chimères dimériques), éventuellement couplées avec des informations fonctionnelles.

Ces deux derniers types d'expériences concernent à la fois des mitochondries isolées, dans lesquelles les protéines n'ont pas quitté leur membrane native, et des protéines solubilisées éventuellement réincorporées dans des systèmes modèles.

Les principaux résultats de la bibliographie sont rassemblés dans le tableau 2.1. Ils sont ensuite partiellement discutés dans le texte de cette section ou des suivantes, en ce qui concerne les techniques que nous avons aussi utilisées.

gènes sont des événements fréquents dans l'évolution des protéines membranaires [Shimizu et al., 2004] ; la famille MCF en est le témoin.

Détermination d'une masse particulaire		
Technique	Transporteur	Référence
Ultracentrifugation analytique	AAC de levure	[Bamber et al., 2006]
	AAC de bœuf	[Hackenberg et Klingenberg, 1980]
Diffusion de neutrons	UCP de hamster	[Lin et al., 1980]
	AAC de bœuf	décrit dans ce chapitre
	AAC de bœuf	[Block et al., 1982]
	AAC de levure	[Dyall et al., 2003]
Electrophorèse native	Oxo. de bœuf, de rat	[Palmisano et al., 1998]
	Citrate de levure	[Kotaria et al., 1999]
	Citrate d'anguille	[Capobianco et al., 2002]
	Phosphate de levure et recombinant	[Schroers et al., 1998]
Chromatographie d'exclusion de taille	AAC de levure	[Bamber et al., 2006]
	Citrate de levure	[Kotaria et al., 1999]
	Phosphate de levure et recombinant	[Schroers et al., 1998]
	AAC de bœuf	[Riccio et al., 1975b] [Smith et al., 2003]
Détermination d'une stœchiométrie		
Fixation CATR	AAC de bœuf	[Riccio et al., 1975a] [Klingenberg et al., 1978]
Fixation BA	AAC de bœuf	[Aquila et al., 1978]
Fixation F-ATR	AAC de bœuf	[Brandolin et al., 1982]
Libération N-ATP	AAC de bœuf	[Dupont et al., 1982]
Liaison nucléotides	UCP de hamster	[Lin et Klingenberg, 1982]
Détermination d'une proximité spatiale		
Pontage chimique	AAC de bœuf	[Hashimoto et al., 1999] [Majima et al., 1995]
	Oxo. de bœuf	[Bisaccia et al., 1996]
	UCP de hamster	[Klingenberg et Appel, 1989]
	PiC de cochon	[Hüther et Kadenbach, 1984]
Construction de chimères	AAC de levure	[Trézégnet et al., 2000] [Huang et al., 2001]
	AAC-PiC de levure	[Hatanaka et al., 1999]
Microscopie électronique	AAC de levure	[Postis et al., 2005]
	AAC de levure	[Brandolin et al., 1980]
Cristallographie 2D	AAC de levure	[Kunji et Harding, 2003]

TAB. 2.1 – **Expériences portant sur l'état oligomérique de la famille MCF.** Ce tableau est compilé notamment à partir des thèses de Bertrand Arnou, Vincent Postis et Cécile Dahout-Gonzalez. PiC est le transporteur de phosphate, UCP la protéine découplante, et oxo. est l'abréviation de oxoglutarate.

2.1.2.1 Chimères dimériques

Description des résultats Trois groupes de recherche différents ont publié des résultats montrant qu'une chimère dimérique d'AAC est fonctionnelle [Hatanaka et al., 1999, Trézéguet et al., 2000, Huang et al., 2001]. Ces chimères sont issues de la fusion de deux gènes codant pour scAAC2 et possèdent un court segment peptidique qui assure la continuité entre le C-terminus d'un transporteur et le N-terminus du suivant. Une souche de levure dépourvue des trois isoformes de l'AAC retrouve la capacité de croissance sur un milieu non fermentescible lorsqu'elle est complémentée par une telle chimère dimérique. De plus, les essais de transport, réalisés sur mitochondrie isolée et en protéoliposomes, montrent des propriétés cinétiques similaires pour la protéine sauvage et les chimères. Enfin, des chimères hétérodimériques dont les deux composantes sont différentes –à cause par exemple d'une mutation– n'ont ni l'activité de transport de la première composante, ni celle de la seconde, ni la moyenne des deux : il existerait donc un effet coopératif entre les « sous-unités » des chimères.

	Terada	Lauquin	Klingenberg
Référence	[Hatanaka et al., 1999]	[Trézéguet et al., 2000] [Postis et al., 2005]	[Huang et al., 2001]
Souche dépourvue	AAC1, 2	AAC1, 2, 3	AAC1, 2, 3
Liaison	(N)–(C)A1M	(N)–GC–(C)	(N)–GS–(C)
Test de la fonction	croissance sur un milieu non-fermentescible Transport mito.	Transport mito.	Transport mito. Transport lipo.
Chimères construites	Wt-Wt	Wt-Wt Wt-R96H R96H-Wt R96H-R96H Wt-PiC PiC-Wt	Wt-Wt Wt-R294A R294A-Wt Wt-R204L R204L-Wt R204L-R204L R204L-R294A

TAB. 2.2 – **Constructions chimériques d'AAC.** Les numéros des résidus sont ceux de scAAC2. Les segments peptidiques qui relient C- et N-termini des « sous-unités » sont donnés pour les chimères Wt-Wt ; il faut garder à l'esprit que les extrémités de la chaîne polypeptidique n'appartiennent pas aux hélices transmembranaires (figure 2.2).

Le tableau 2.2 récapitule les expériences conduites avec des chimères dimériques d'AAC. Il peut être utile de rappeler les caractéristiques des mutants fusionnés avec la protéine fonctionnelle. La mutation R96H, appelée *op1*, implique un acide aminé aligné avec R79 chez bAAC1, résidu basique placé à mi-hauteur de la cavité, qui appartiendrait au filtre de sélectivité (deux derniers panneaux de la figure 1.8 à la page 17). La souche mutante n'est pas viable et la protéine portant R96H a une activité de transport faible. Les mutants R204L et

R294L concernent des arginines correspondant à R187 (seconde surface basique de la cavité) et R279 (filtre de sélectivité). Les souches mutantes ne sont pas viables et la protéine portant R204L a une activité de transport nulle.

Que nous apprennent ces chimères sur l'état oligomérique du transporteur ? Le fait que la fusion conserve la fonction de la protéine n'est pas une preuve de l'existence du dimère en soi : rien n'interdit la possibilité que les deux « sous-unités » fonctionnent côte à côte comme monomères. Les arguments qui concernent les quantités de protéines, semblables pour des activités comparables, entre la protéine sauvage et une chimère [Trézéguet et al., 2000] [Huang et al., 2001] ne sont valables que si l'ensemble des transporteurs d'ADP et d'ATP sont actifs simultanément. Si seule une fraction de la protéine participe au transport, alors on ne peut pas corréler activité et quantité de protéine.

La coopérativité entre « sous-unités » est particulièrement difficile à interpréter. Ainsi une chimère Wt-R96H ne se comporte pas comme la protéine sauvage, alors que c'est le cas d'une chimère Wt-PiC. Les explications des auteurs ne permettent pas de décrire sans ambiguïté le comportement de ces chimères dans le cadre d'un modèle dimérique. Gardons donc à l'esprit qu'une « sous-unité » voit l'autre et qu'on ne comprend guère ni quand, ni comment.

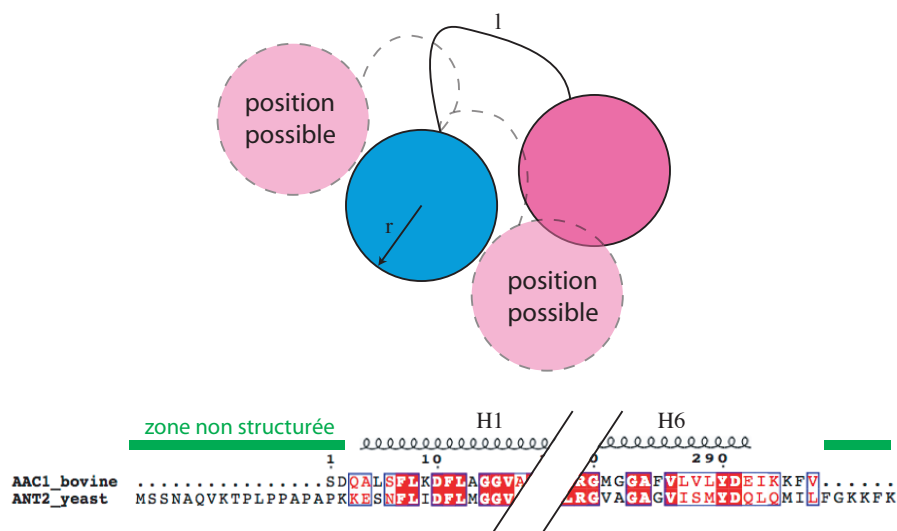


FIG. 2.2 – **Longueur du segment non structuré pour les chimères dimériques.** Dès que la longueur l du segment non-structuré –environ 100 Å ; on a une idée avec l'alignement de séquences entre bAAC1 et scAAC2– dépasse le rayon r de la protéine vue comme un cylindre (environ 20 Å), alors il n'est plus possible ni de définir, ni d'exclure une zone latérale comme zone d'interaction.

Proximité spatiale entre « sous-unités » A l'aide du modèle cristallographique de bAAC1 et d'alignements de séquences entre la protéine bovine et de levure, on peut comparer la longueur du segment peptidique sans structure secondaire définie, qui relie la fin de l'hélice **H6** de la première « sous-unité » et le début de l'hélice **H1** de la seconde, au rayon du monomère. Suivant les constructions, ce segment comprend entre 34 et 41 résidus [Postis et al., 2005]. La distance moyenne entre deux C_α consécutifs est de 3,5 Å pour un peptide non structuré. Comme l'illustre le schéma de la figure 2.2, ce segment non structuré est trop long pour permettre de conclure quant à la proximité entre telle et telle hélice dans un modèle dimérique.

2.1.2.2 Pontage chimique

Pontage du transporteur d'ADP et d'ATP Des expériences de formation de ponts inter-moléculaires, par l'intermédiaire d'une liaison disulfure impliquant un cuivre phénantroline [Majima et al., 1995] ou via des agents pontants dimaléimides rigides de longueurs diverses, réactifs vis à vis des groupements thiols [Hashimoto et al., 1999], ont été réalisés dans le groupe de Terada. Ces expériences montrent la possibilité de pontage intermoléculaire uniquement entre deux cystéines 56 de bAAC1³, dans la seule conformation inhibée par le BA, et avec une longueur préférentielle de 12 Å.

L'absence de formation de ponts impliquant les autres cystéines indique que celles-ci sont :

- soit trop éloignées lorsque deux particules sont proches ou en contact,
- soit non accessibles au solvant, car protégées par la membrane (les agents pontants utilisés ne pénètrent pas dans la membrane) ou enfouies dans la protéine.

Dans le modèle atomique de bAAC1-CATR, la chaîne latérale de la cystéine 56 pointe vers l'intérieur de la protéine, elle est en interaction avec la tyrosine 50. Son exposition au solvant est presque nulle, en accord avec l'impossibilité de pontage en présence de CATR.

Les auteurs concluent que la boucle matricielle **M1** qui contient C56 a un comportement différent de celui des deux boucles équivalentes, caractérisé par un mouvement ample lors du transport.

Efficacité du pontage Il y a peu d'indications concernant l'efficacité du pontage dans les publications. Il est écrit que 100 μ M d'agent pontant permettent d'observer une diminution de moitié de la quantité de monomère sur un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. Cependant, la concentration protéique n'est pas clairement donnée. On peut en avoir une idée grossière via la concentration des protéines totales des mitochondries (20 mg/mL d'après [Majima et al., 1993]), sachant que bAAC1 représente environ 15% des protéines mitochondriales. Avec cette approximation, on a seulement un excès 2 :1 molaire d'agent pontant par rapport à la protéine.

³Rappelons que bAAC1 contient quatre cystéines : C56, C159, C256 qui sont reliées par la pseudo-symétrie interne d'ordre trois, et C128 qui est au milieu de l'hélice **H3**.

Pontage d'autres transporteurs D'autres expériences de pontage chimique ont eu lieu pour les transporteurs de phosphate [Hüther et Kadenbach, 1984], d'oxoglutarate [Bisaccia et al., 1996], et pour la protéine découplante [Klingenberg et Appel, 1989].

L'ajout d'un cuivre phénantroline dans une solution micellaire, ou dans un système de protéoliposomes du transporteur de phosphate, inhibe le transport uniquement dans le premier cas. Cette donnée est difficile à interpréter en terme d'état oligomérique. L'interprétation simpliste consiste à dire que les groupes thiols du transporteur de phosphate sont proches en micelles et éloignés ou non accessibles en protéoliposomes.

Le même agent pontant peut permettre la formation de ponts intermoléculaires entre UCP. L'efficacité du pontage est supérieure sur mitochondrie isolée que sur la protéine purifiée en Triton X100. Seule la cystéine la plus proche du C-ter, exposée dans l'espace intermembranaire, est impliquée dans la formation des ponts, comme le montre l'étude de la protéine dépourvue des onze résidus C-terminaux.

L'étude du transporteur d'oxoglutarate à l'aide de composés maléimides fluorescents indique l'existence d'un pont disulfure naturel entre les cystéines 221 et 224 placée sur l'hélice **H5**. Le travail n'apporte pas d'indication quant au caractère intermoléculaire de ce pont.

2.1.2.3 Electrophorèse native

Les techniques d'électrophorèses dites natives s'opposent à celles très courantes qui ont lieu en conditions dénaturantes. Les échantillons destinés à une électrophorèse dénaturante sont mis en présence de SDS, un détergent chargé qui permet de séparer les complexes protéiques en leurs composants individuels, et confère une densité de charge homogène à toutes les protéines. Les échantillons sont parfois chauffés afin d'accélérer ou de permettre une plus grande dénaturation des protéines. A l'inverse, pour une électrophorèse native, les échantillons sont placés dans un milieu « doux », ce qui correspond généralement à la présence d'un détergent non ionique. Le but est de maintenir l'état oligomérique des complexes au cours de l'expérience.

Les techniques d'électrophorèse native des protéines membranaires sont délicates à mettre en oeuvre. La première difficulté est la préservation de l'oligométrie native lors de la **solubilisation** de la protéine d'intérêt. Typiquement ici, la solubilisation des mitochondries a lieu avec 2% de digitonine [Palmisano et al., 1998, Capobianco et al., 2002] ou 0,16% de DDM [Dyall et al., 2003]. On peut s'interroger sur le sens de l'oligométrie native dans le cas de protéines surproduites dans *E. coli* et renaturées par ajout de sarkosyl puis dialysées dans un détergent doux [Kotaria et al., 1999, Schroers et al., 1998]⁴.

⁴Schroers *et al.* comparent la migration de la protéine « monomérique » en sarkosyl, et celle de la protéine « dimérique » en $C_{12}E_8$, mais il est difficile d'exclure que la différence de migration ne puisse être liée simplement aux différences des caractéristiques de ces deux détergents.

La seconde difficulté tient dans le protocole de l'expérience lui-même. Dans le laboratoire de Gérard Brandolin, et lors des essais –peu nombreux– que j'ai réalisés, les gels obtenus ne sont pas convaincants. Une solide habitude et un protocole bien adapté au système semblent nécessaires pour réaliser de beaux gels natifs.

Ces réserves énoncées, on constate cependant que l'électrophorèse native a été largement employée pour déterminer l'état oligomérique du transporteur d'ADP et d'ATP [Dyall et al., 2003, Palmisano et al., 1998], de phosphate [Schroers et al., 1998], de citrate [Kotaria et al., 1999], de tricarboxylate [Capobianco et al., 2002] et d'oxoglutarate [Palmisano et al., 1998]. L'ensemble de ces travaux, à l'exception de celui de Kotaria et al., présentent des gels comparés, c'est-à-dire des gels en conditions dénaturantes qui montrent un monomère, et des gels en conditions natives qui montrent un dimère. Les protéines d'intérêts sont mises en évidence spécifiquement, qu'il s'agisse de la liaison d'un anticorps ou d'une mesure de radioactivité.

Après lecture de ces articles, je peux partager mon impression subjective –et teintée d'arbitraire– sous forme d'une note de confiance dans les expériences présentées. Dans le sens de la confiance croissante, je rangerais les références dans l'ordre suivant : [Kotaria et al., 1999] < [Schroers et al., 1998] < [Capobianco et al., 2002] < [Palmisano et al., 1998] \simeq [Dyall et al., 2003].

2.1.2.4 Stœchiométrie de liaison des inhibiteurs

Dans l'article de Riccio *et al.* de 1975 [Riccio et al., 1975b] qui décrit la première purification de l'AAC, les auteurs déterminent un rapport de fixation CATR–AAC de 17,6 $\mu\text{mol/g}$ environ, confirmé dans une publication de 1978 [Klingenberg et al., 1978]. Compte tenu de la masse moléculaire de la protéine (32,8 kDa), **ce rapport est de 1,15 molécules de CATR par dimère de bAAC1.**

Peut-on estimer l'erreur expérimentale sur ce résultat ? Le dosage de la protéine est réalisé avec un protocole modifié de Lowry ; tandis que le dosage du CATR est réalisé par scintillation. Les méthodes de dosage par radioactivité sont précises. Il m'est par contre arrivé de doser bAAC1 par la méthode de Lowry et par micro-analyse en acides aminés après hydrolyse acide conjointement. L'écart entre les valeurs obtenues était variable, avec un écart maximum de 37% (qui va dans le sens d'un inhibiteur par monomère : la protéine est surévaluée par le dosage Lowry. Voir à ce propos l'annexe page 158). Si on garde cette erreur, pas plus arbitraire qu'une autre, le rapport CATR–protéine se situe alors dans l'intervalle $[0,81 ; 1,5]$.

Dans un article d'Aquila et al. [1978], provenant toujours du groupe de Klingenberg, les auteurs isolent et décrivent la protéine liée au BA. Ils montrent notamment que la fixation du BA et du CATR sont mutuellement exclusives, et introduisent l'idée des deux conformations différentes stabilisées par les inhibiteurs. La quantification du BA fixé est rapportée comme délicate, à cause de la tendance de ce composé lipophile à se fixer non spécifiquement dans les micelles de détergent. Ces travaux préfigurent les grandes difficultés rencontrées

lors de la purification à des fins structurales du complexe AAC-BA, qui achoppe notamment sur la séparation (et la quantification) du BA libre et lié. On n'y trouve pas d'élément de stœchiométrie de type 2 :1, bien que ce soit en général cette référence qui est citée pour appuyer l'assertion qu'il se fixe une molécule d'inhibiteur pour deux molécules de protéines.

2.1.2.5 Stœchiométrie du transport des nucléotides

On détermine la stœchiométrie de l'échange entre ADP et ATP grâce à des dosages de nucléotides lors de transports en systèmes reconstitués. Par exemple Brandolin et al. [1980] incorporent la protéine bovine purifiée dans des liposomes de phosphatidylethanolamine et de cardiolipides. L'intérieur de ces liposomes contient 20 mM d'ATP, et on ajoute à l'extérieur de l'ADP radioactif marqué au ^{14}C . On peut ainsi suivre, d'une part la quantité d'ADP transportée dans les liposomes grâce à une mesure de scintillation, et d'autre part la quantité d'ATP transportée hors des liposomes grâce à une réaction avec la luciférase. Les auteurs ajoutent un mélange des deux inhibiteurs pour bloquer le transport, afin d'obtenir des mesures à différents temps. Ils observent un échange d'un ADP pour un ATP quel que soit le moment de la mesure ou l'état d'inhibition partielle de la protéine (figure 2.3 à gauche). Cet échange est strict, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de sortie d'ATP sans ajout d'ADP.

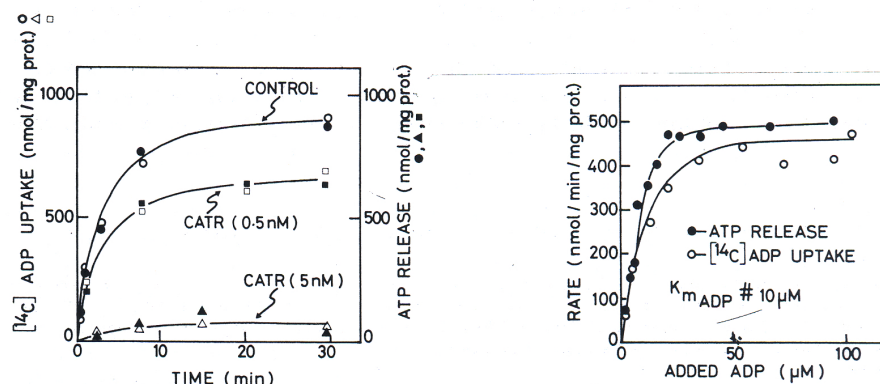


FIG. 2.3 – Stœchiométrie 1 :1 de l'échange ADP-ATP par bAAC (à gauche), impossibilité du transport asymétrique (à droite). Dosage par radioactivité et luminescence du transport d'ADP et d'ATP en protéoliposomes. Ces figures sont reproduites depuis Brandolin et al. [1980].

Contrairement aux précédentes, les expériences d'électrophysiologie réalisées par le groupe de Bamberg [Brustovsky et Klingenberg, 1996, Brustovsky et al., 1997, Gropp et al., 1999] montrent la possibilité d'initier un échange avec un système asymétrique de protéoliposomes dont l'intérieur est dénué de nucléotides [Gropp et al., 1999].

D'autres groupes ont étudié de façon approfondie le transport de nucléotides en système reconstitué. Cependant les mesures effectuées concernent à ma connaissance un seul des deux lots de nucléotides, en général marqué. Ainsi, que ce soit dans les travaux de Sluse ou de Palmieri, il n'y a pas d'autres articles que je connais qui permettent de s'assurer de la stœchiométrie 1 :1.

2.1.2.6 Autres approches

Une expérience assez convaincante de « differential tagging » [Schroers et al., 1998] teste l'activité du transporteur de phosphate de levure exprimé chez *E.coli*, en protéoliposomes. Cette activité est normale pour une protéine identifiée comme dimérique grâce à une stratégie utilisant des étiquettes multiples avant reconstitution mais elle est nulle pour des dimères dont l'une des deux « sous-unités » n'est pas fonctionnelle. De plus, lors de la reconstitution de monomères, l'activité de transport est faible tant qu'on n'atteint pas une concentration critique, significative de la nécessité fonctionnelle de la dimérisation pour les auteurs. La figure 2.4 correspondante est reproduite ci-dessous.

Dans l'article qui établit la stœchiométrie 1 :1 de l'échange ADP-ATP [Brandolin et al., 1980] se trouvent également des expériences de microscopie électronique après cryofracture. Ces expériences montrent des liposomes dont une petite portion contient un ou plusieurs complexes protéiques. Il n'est pas possible de différencier un dimère d'un monomère à partir de ces images (Gérard Brandolin, communication personnelle). Les auteurs observent en outre une distribution différentielle des particules dans les fractures concaves et convexes en fonction de l'inhibiteur ajouté aux préparations, ce qui laisse à penser que les deux conformations inhibées ne sont pas insérées de manière équivalente dans la membrane. La conformation BA posséderait une plus grande zone exposée à la matrice que la conformation CATR.

2.1.2.7 Tétramères et autres complexes compliqués

Des états oligomériques plus complexes ont été supposés ou décrits pour le transporteur d'ADP et d'ATP. Ainsi le nombre de sites de fixation des nucléotides pourrait correspondre à une organisation tétramérique. D'autre part, des complexes hétérogènes liés à la fonction respiratoire (l'ATP synthasome de Chen et al. [2004]) ou apoptotique (le pore mitochondrial de perméabilité de Ferri et al. [2000]) ont été imaginés. La composition moléculaire exacte de tels complexes, s'ils existent, n'est pas connue.

2.1.3 Définition d'une interface d'interaction

Nous avons évoqué les expériences de la littérature qui donnent accès à des informations de proximité entre protéines. On peut utiliser, avec précaution, ce type d'expériences pour tenter de délimiter une interface d'interaction d'un monomère avec un autre. On peut également tenter d'interpréter certaines données

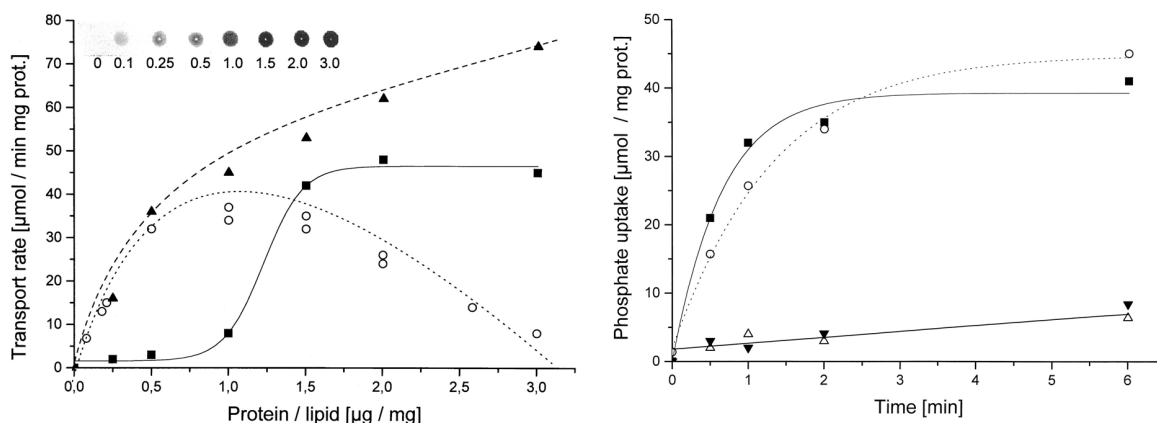


FIG. 2.4 – **Dimérisation fonctionnelle du transporteur de phosphate.** A gauche un essai de transport en système reconstitué pour du transporteur purifié à partir de mitochondries (cercles) ou obtenu en corps d'inclusion et solubilisé en sarkosyl et C12E8 (carrés) ou C12E8 (triangles). Les auteurs affirment que les carrés correspondent à du transporteur monomérique pour lequel on observe un effet de seuil (c'est seulement lorsque deux protéines sont présentes par liposome que le transport peut avoir lieu, ce qui correspond à 1,25 μg de protéine par mg de lipide environ), et que les triangles correspondent à du transporteur dimérique. A droite la cinétique du transport pour différentes constructions : PiC-His (cercles), hétérodimère PiC-His/PiC-FLAG (carrés), et les hétérodimères inactivés par le NEM (deux types de triangles). L'étiquetage différentiel permet de s'assurer qu'on a des dimères, et le traitement au NEM exclut la possibilité d'un monomère fonctionnel.

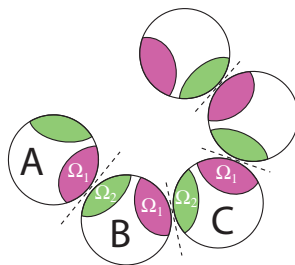
sur les protéines mutantes (par exemple sur les révertants) en termes géométriques ou encore raisonner sur les conséquences géométriques des symétries du système.

Un écueil d'une telle interprétation géométrique provient de l'utilisation d'une structure cristalline, par définition statique, pour représenter un système dynamique. Si deux résidus sont proches au sein d'une interface dimérique *in vivo*, ils ne le sont pas forcément lorsqu'on place côte-à-côte deux monomères dans la conformation stabilisée par le CATR. L'esprit critique en éveil, considérons d'un peu plus près ces résultats ayant des conséquences géométriques, rassemblés sur la figure 2.5. Le but de cette figure est d'illustrer l'absence –partielle?– de convergence entre les différentes données concernant la surface d'interaction.

2.1.4 Considérations de symétrie

L'échange d'un ADP contre un ATP, la triplication dans la séquence des transporteurs MCF, sont deux exemples de résultats où la symétrie est sous-jacente. Cette courte section énonce les questions ouvertes soulevées par la ou les symétries du système.

Est-il nécessaire que le dimère soit symétrique ? La symétrie par rapport à l'interface est un fait implicite pour un dimère cristallographique où les deux sous-unités sont images l'une de l'autre (voire page 161), c'est également un fait implicite des expériences de pontage des cystéines 56 de bAAC1 [Hashimoto et al., 1999]. Rien ne force pourtant une telle symétrie, et on peut imaginer qu'une zone d'un monomère puisse interagir avec une autre zone du second monomère. Dans ce dernier cas, une oligomérisation en chaîne pourrait avoir lieu (le monomère A par sa zone Ω_1 interagit avec B via sa zone Ω_2 ; alors la zone Ω_1 de B peut interagir avec la zone Ω_2 de C, et ainsi de suite comme le montre le schéma ci-dessous).



Comment concilier dimérisation et symétrie d'ordre trois ? A cause de la pseudo-symétrie d'ordre trois, si l'AAC présente une interface de dimérisation, il possède également deux zones « équivalentes », celles qui correspondent à l'interface via la pseudo-symétrie interne. Une déviation par rapport à cette

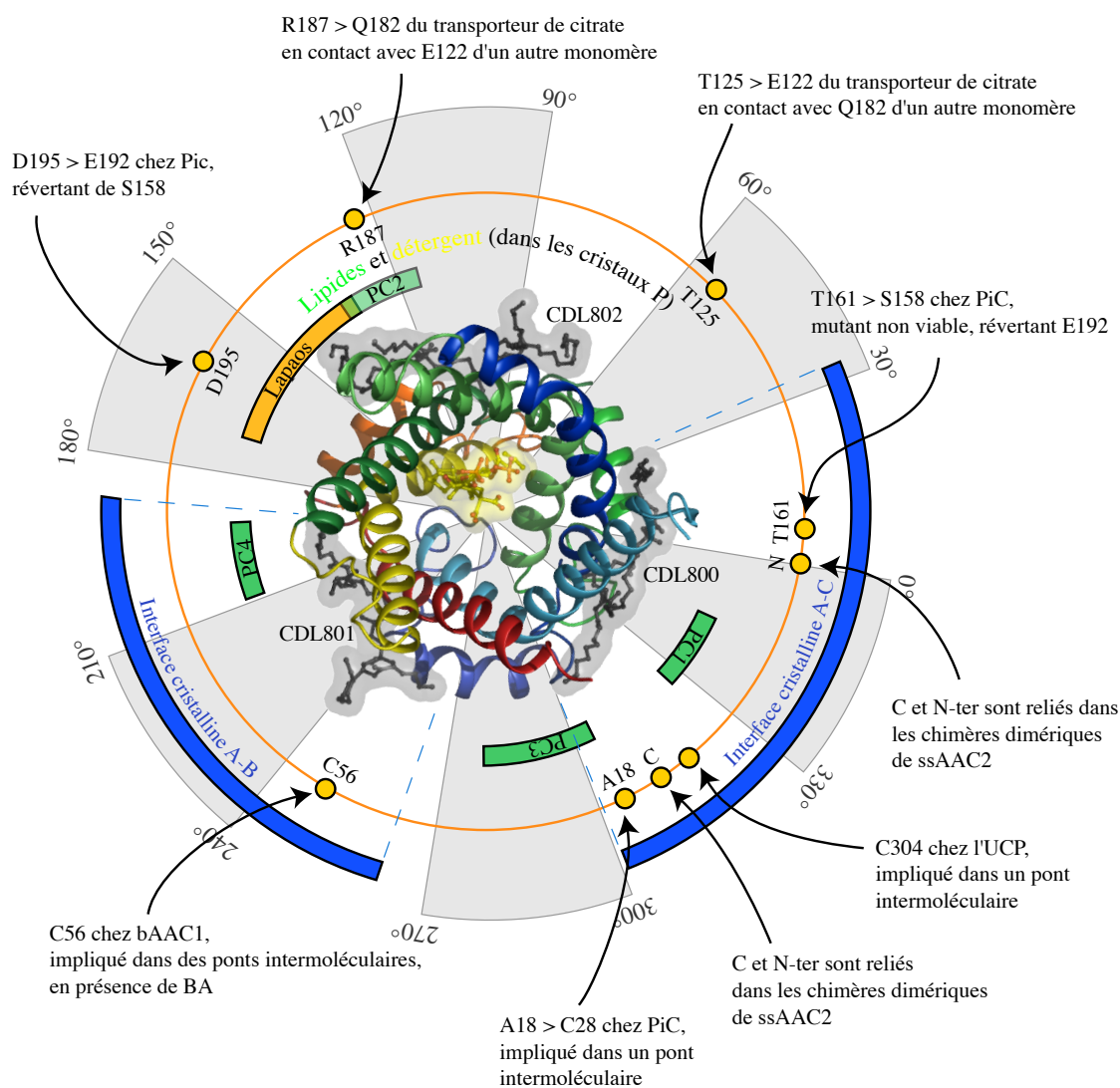


FIG. 2.5 – Où pourrait se trouver l'interface de dimérisation ? Au centre est montrée la structure cristallographique du complexe bAAC1-CATR vue depuis l'espace intermembranaire, entourée des trois cardiolipides visibles dans les cristaux de forme centrée. La position des lipides et des molécules de détergent dans les cristaux de forme primitive est indiquée par des arcs de cercle. La position de certains résidus (ou du résidu correspondant s'il s'agit de données concernant un autre transporteur MCF) impliqués dans des contacts entre monomères est notée en jaune. Enfin les interfaces vues dans la nouvelle forme cristalline sont grossièrement délimitées en bleu. Les données pour le transporteur de phosphate sont celle de ; celles pour le transporteur de citrate de

pseudo-symétrie est alors nécessaire permettre à la seconde sous-unité de discriminer l'interface entre ces trois zones. A l'inverse pourquoi ne pas imaginer une interface triple ?

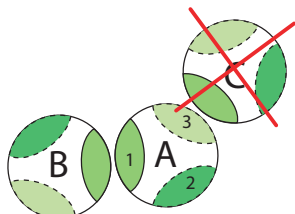


FIG. 2.6 – **Dimérisation et pseudo-symétrie d'ordre trois.** Le monomère central A possède une interface de dimérisation 1, et deux zones équivalentes 2 et 3 à cause de la pseudo-symétrie. Pour empêcher des appariements de type A-C, il faut que la zone 1 soit suffisamment différente des zones 2 et 3.

L'analyse de la surface de la protéine peut ici apporter des éléments de réponse. En effet on imagine intuitivement que les propriétés électrostatiques ou de conservation d'une éventuelle zone d'interface la différencie du reste de la surface protéique, sans que ces différences nous permettent forcément de l'identifier.

Symétrie par rapport au plan médian de la membrane Le transport est dirigé par le gradient de potentiel transmembranaire. En l'absence de gradient le transport a lieu indifféremment dans les deux sens. Le transport est donc symétrique par rapport au plan médian de la membrane. Cela indique qu'il convient de prendre toutes ces considérations de symétrie avec un fort esprit critique. En effet cette symétrie fonctionnelle du transport ne se reflète pas du tout au niveau structural : la partie matricielle de la protéine est bien différente de sa partie qui fait face à l'espace inter-membranaire, dans la conformation inhibée par le CATR.

2.2 Analyse de l'état oligomérique par ultracentrifugation analytique

L'ultracentrifugation analytique est une méthode de choix pour l'analyse des complexes membranaires en solution. Elle permet en effet d'en déterminer le rayon hydrodynamique et la masse, ainsi que la quantité de détergent et de lipides associés à la protéine.

Les expériences d'ultracentrifugation analytiques ont été menées en collaboration avec Christine Ebel (LBM, IBS). C'est elle qui a placé les échantillons dans la centrifugeuse puis analysé les données. J'ai néanmoins suivi et participé à cette analyse.

2.2.1 Principe et méthodes

2.2.1.1 Principe

Dans une cellule placée dans une centrifugeuse, on suit l'évolution de deux paramètres biophysiques fonction de (r, t) ⁵ : l'absorbance à 280 nm, et un signal d'interférence relatif à la variation d'indice du milieu. Ces paramètres reflètent les variations de concentration, uniquement de la protéine pour l'absorbance, et de toutes les espèces en solution pour le signal d'interférence. Ils permettent, grâce à la résolution de l'équation de transport, d'obtenir les coefficients de sédimentation et de diffusion de la particule. Ce sont ces coefficients qui sont fonction de la masse, de la composition, du rayon et de la forme des particules.

2.2.1.2 Protocole expérimental – paramètres utilisés

Les expériences sont réalisées dans une centrifugeuse Beckmann XLI, à une vitesse de rotation de 42000 tpm, avec des cellules doubles de 12 mm de trajet optique. Des enregistrements de l'absorbance à 280 nm et du signal d'interférence ont lieu toutes les 6 minutes tout au long des expériences d'une durée typique de 12 heures. Les mesures sont faites à 10°C (échantillons de Lapao et de protéine) ou 20°C (mélange lipides-Lapao). Les données sont analysées à l'aide des logiciels développés par Peter Schulk, Sedfit et Sedfat⁶, ce dernier programme permettant l'analyse simultanée de plusieurs expériences. Les autres paramètres nécessaires au traitement sont obtenus expérimentalement (mesure des densités et des viscosités avec les appareils Anton-Paar DMA500 et AMVn) ou par le calcul (Sednterp pour le calcul de volumes partiels spécifiques). La liste de ces paramètres est regroupé dans le tableau 2.3.

⁵ r est la distance à l'axe de rotation et t le temps.

⁶Modélisation à une espèce sans interactions interparticulaires. Les échantillons de complexe protéique en tampon hydrogéné ont également été analysés en terme de distribution $c(s)$.

Paramètre	Symbole	Unité courante	Unité [SI]
viscosité	η	centipoise cp	$10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{m}$
masse volumique	ρ	g/mL	$10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$
rayon hydrodynamique	R_H	Angström Å	10^{-10} m
masse particulaire	M	Da	$10^3 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$
masse flottante	M_B	Da	$10^3 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$
coefficient de sédimentation	s	Svedberg S	10^{-13} s
coefficient de diffusion	D	Ficks F	$10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
volume partiel spécifique	\bar{v}	mL/g	$10^3 \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$
concentration	c	mg/mL	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
distance à l'axe	r	mm	10^{-3} m
temps	t	s	s
nombre de frange	J	sans d'unité	
absorbance à 280 nm	A_{280}	unité arbitraire	
nombre d'Avogadro	N_a	sans d'unité	
température	T	Kelvin K	K
constante des gaz parfaits	R		
fraction massique liée	B	g/g	sans d'unité
vitesse angulaire de rotation	w	$\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$	$\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$

TAB. 2.3 – **Les principaux paramètres physiques utilisés en centrifugation analytique.** Les expressions mathématiques qui relient ces paramètres sont présentées dans le paragraphe 2.2.1.4. Ces paramètres sont indicés dans le texte par l'initiale de l'espèce à laquelle ils se rapportent, par exemple \bar{v}_d pour le détergent, \bar{v}_p pour la protéine et \bar{v}_{d+l} pour le mélange Lapao-lipides. Les valeurs de certains paramètres sont fixées : $\eta_{H_2O} = 1,303 \text{ cp}$; $\eta_{H_2O} = 1,303 \text{ cp}$; $\rho_{H_2O} = 1,001 \text{ g/mL}$; $\rho_{D_2O} = 1,104 \text{ g/mL}$; $\bar{v}_p = 0,741 \text{ mL/g}$.

2.2.1.3 Préparation des échantillons

Les échantillons concernés sont les mêmes que ceux qui nous serviront pour la diffusion de neutrons aux petits angles (figure 2.7). La protéine est purifiée selon le protocole habituel par deux étapes de chromatographie [Dahout-Gonzalez et al., 2003] (voir aussi l'annexe page 157, et éventuellement le paragraphe page 72), une moitié du lot n'est pas incubée en présence de Biobeads. On réalise également pour chaque lot un échange $H_2O - D_2O$ par dialyse.

Il faut noter la préparation d'un lot supplémentaire important : le mélange de lipides membranaires et de Lapao *sans* protéine. Ce lot n'est pas obtenu en mélangeant des lipides purs et du détergent, mais à partir d'une préparation protéique –dont on extrait la protéine–, ceci afin de ressembler le plus possible aux « vrais » échantillons. Il s'agit donc d'échantillons « à l'identique » pour lesquels la protéine purifiée est lyophilisée puis reprise dans un mélange de chloroforme et de méthanol. La phase organique contenant les lipides et le détergent est lyophilisée de nouveau, tandis que la protéine et les sels, insolubles dans cette phase, sont éliminés. Les résidus secs sont repris dans le tampon de la chromatographie d'exclusion de taille, hydrogéné ou deutéré selon les cas, de telle sorte que les concentrations de lipides et de détergent soient sensiblement les mêmes que dans les échantillons protéiques.

L'absorbance à 208 nm de ces échantillons est d'environ 25% de celle des échantillons protéiques. L'origine de ce phénomène est double : il s'explique par la présence 1. de protéine résiduelle, 2. d'un contaminant absorbant dans cette gamme de longueur d'onde.

Ces échantillons « à l'identique » nous servent en ultracentrifugation analytique à déterminer le volume partiel spécifique d'un mélange lipides-Lapao ; en diffusion de neutrons on les utilise pour déterminer le point d'annulation du contraste.

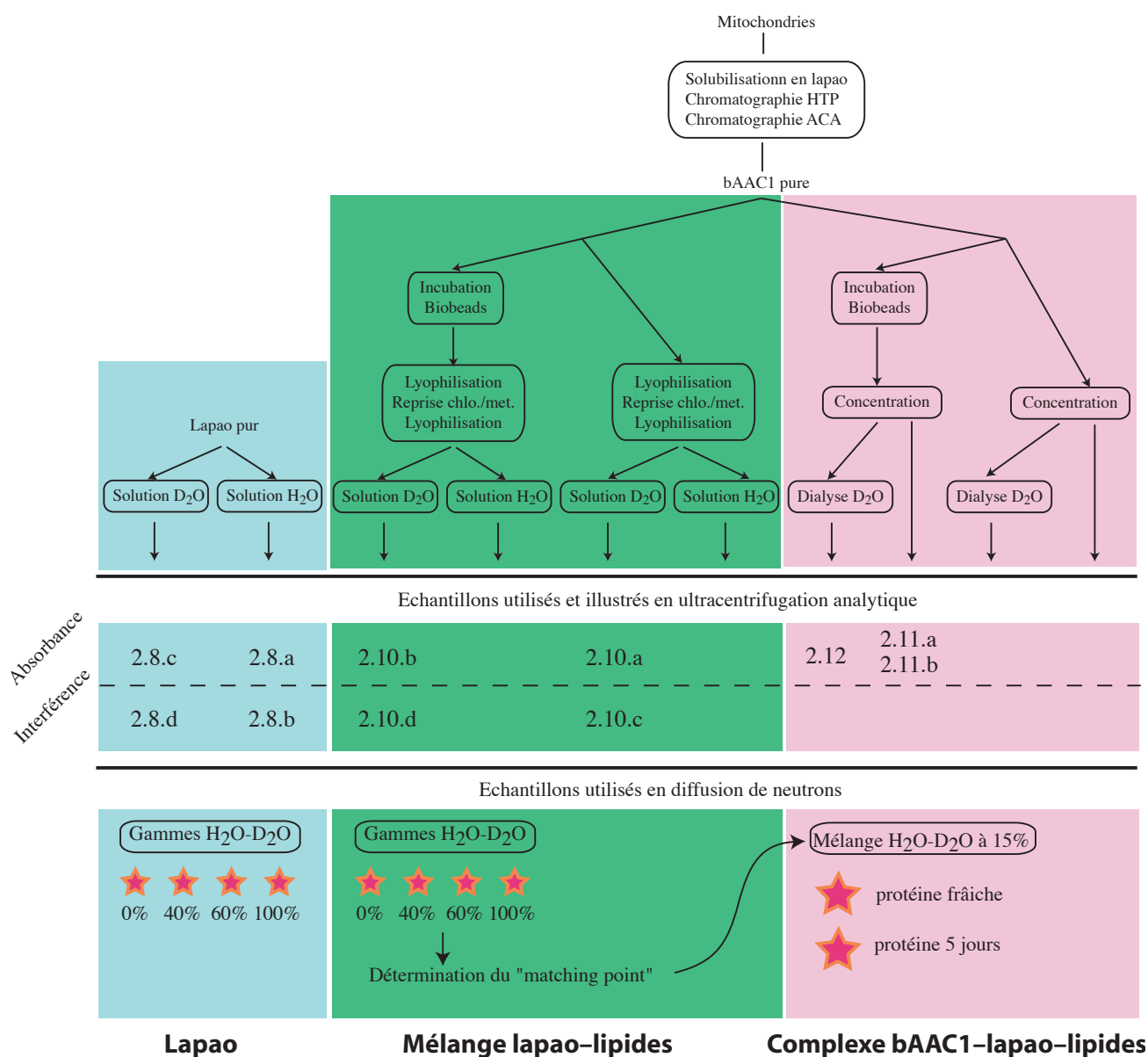


FIG. 2.7 – Echantillons utilisés lors des expériences d’ultracentrifugation analytique et de diffusion de neutrons. Ces échantillons sont présentés en même temps car nous avons utilisé les mêmes pour les deux types d’expériences afin de pouvoir comparer les résultats obtenus. Les numéros font références aux figures correspondantes aux échantillons analysés en AUC, analyse décrite dans le texte. Les étoiles rouges indiquent les échantillons préparés puis soumis au flux de neutrons (voir page 61). Le terme protéine "fraîche" indique que la purification a été réalisée immédiatement avant les expériences d’AUC et de SANS. Pour l’AAC purifié en présence de CATR, la conservation à 4°C pendant quelques jours ne devrait pas être problématique, et nous avons également travaillé avec un échantillon protéique purifié 5 jours avant les expériences.

2.2.1.4 Résolution de l'équation de transport, coefficients de sédimentation et de diffusion

Les observables A_{280} ou J (déplacement d'un nombre de franges d'interférences) sont proportionnelles à la concentration c du complexe membranaire, utilisée à leurs places par la suite. L'enregistrement de leurs valeurs permet de résoudre numériquement l'équation de transport, ou équation de Lamm⁷ :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} [r(cs\omega^2 r - D \frac{\partial c}{\partial r})] \quad (2.1)$$

et d'accéder aux valeurs des coefficients de sédimentation s et de diffusion D . Ceux-ci sont reliés aux paramètres particuliers du complexe par les relations de Stokes-Einstein et de Svedberg :

$$D = \frac{RT}{6\pi N_a \eta R_H} \quad (2.2)$$

$$s = \frac{M_B}{6\pi N_a \eta R_H} \quad (2.3)$$

Enfin la masse flottante M_B est définie grâce aux proportions et aux volumes partiels spécifiques de chaque composant du complexe :

$$M_B = M_p(1 - \rho \bar{v}_p) + M_p B_{d:p}(1 - \rho \bar{v}_d) + M_p B_{l:p}(1 - \rho \bar{v}_l) \quad (2.4)$$

Et le rayon hydrodynamique peut s'exprimer par rapport au rayon R_0 de la sphère compacte représentant la particule, grâce à un facteur de forme empirique, $\frac{f}{f_0}$ dont la valeur est d'environ 1,25 pour une particule globulaire compacte :

$$R_H = \frac{f}{f_0} R_0 \quad (2.5)$$

$$\frac{4\pi}{3} R_0^3 = \frac{1}{N_a} (M \bar{v}_p + M B_{d:p} \bar{v}_d + M B_{l:p} \bar{v}_l) \quad (2.6)$$

Les équations 2.4 et 2.6 peuvent se simplifier en regroupant le terme du détergent et celui des lipides car leurs volumes partiels spécifiques sont proches [Gohon et al., 2004]. On considère ainsi un paramètre B global, pour lequel on omettra l'indice, qui est la fraction de lipides et de détergent liée à la protéine et un volume partiel spécifique commun \bar{v}_{d+l} .

D'autre part, en tampon deutéré, on modifie la masse de la protéine en tenant compte de la fraction d'hydrogènes échangés. Dans le cas du détergent et des lipides, on ne fait pas cette modification dont l'effet est négligeable, car les volumes partiels spécifiques de ces espèces sont proches de 1.

⁷Le second terme du membre de droite rend compte de la diffusion qui a tendance à égaliser la concentration dans la cellule, le premier terme indique l'effet de la sédimentation qui tend à concentrer toutes les molécules au fond de la cellule.

2.2.2 Les volumes partiels spécifiques du Lapao et du mélange Lapao-lipides

Les expériences réalisées avec le détergent seul, ou avec le mélange Lapao-lipides permettent d'accéder à la vitesse de sédimentation de ces espèces, qu'on utilise principalement pour connaître leurs volumes partiels spécifiques. La valeur expérimentale que nous déterminons est (légèrement) plus faible que celle rapportée par Le Maire [le Maire et al., 2000] : $\bar{v}_d \simeq \bar{v}_{d+l} \simeq 1,00 < \bar{v}_d^{litt.} \simeq 1,067$ mL/g.

2.2.2.1 Lapao

La concentration du Lapao est d'environ 5% massique dans l'échantillon. On n'observe pas, en absorbance, de sédimentation significative (figure 2.8)⁸. En interférence, on observe la flottaison faible de l'échantillon dans les deux tampons H₂O et D₂O, c'est donc ce signal qui est analysé. On obtient alors $s_{H_2O}^{10^\circ C} = -0,005 \pm 0,004$ S, $D_{H_2O}^{10^\circ C} = 5,2 \pm 0,6$ F, $s_{D_2O}^{10^\circ C} = -0,21 \pm 0,03$ S, $D_{D_2O}^{10^\circ C} = -6,5 \pm 0,6$ F. En plus d'un fort bruit systématique, de l'effet de concentration (qui réduit artificiellement s et D), la flottaison est faible, et il est donc difficile de fixer la valeur de J_{tot} .

Une modélisation globale avec Sedfat donne un volume partiel spécifique $\bar{v}_d = 1,002$ mL/g. Par ailleurs, un modèle de micelle sphérique compacte est en accord relatif avec les données expérimentales pour un \bar{v}_d proche de 1 (voir la figure 2.9), c'est donc cette valeur que nous retenons pour la suite.

2.2.2.2 Mélange de Lapao et de lipides : échantillons « à l'identique »

Les mesures effectuées dans le tampon H₂O montrent, en absorbance comme en interférence, une très faible flottaison (résultats non montrés). Cette flottaison est plus nette en D₂O et ce sont donc ces mesures qui sont analysées (figure 2.10).

On observe en absorbance, près du ménisque, là où les particules s'accumulent, une zone de très forte absorption dont la taille augmente avec le temps. Cette zone est exclue pour l'analyse des données ; l'absorbance peut être celle du contaminant inconnu dont nous avons déjà noté la présence dans nos préparations protéiques. En interférence, le signal près du ménisque est moins surprenant, cependant cette zone n'est pas en accord avec un modèle à une espèce. On ne considère donc que la sédimentation hors de cette zone, et dans le cadre d'un modèle d'une unique espèce idéale, on obtient les valeurs données dans la tableau 2.2.2.2.

On note cependant deux différences liées au traitement par Biobeads. La première est la **diminution du nombre de franges** J_{tot} après traitement. On peut corrélérer cette diminution à une baisse de la concentration en Lapao moyennant une hypothèse forte, celle de considérer que le Lapao et le mélange Lapao-lipides ont tous deux le même indice de réfraction que le $C_{12}E_8$. Dans ce cas, la baisse de concentration en Lapao serait de l'ordre de 30% (avant dernière ligne du tableau précédent). Cette valeur est acceptable, le dosage du Lapao marqué pendant le traitement Biobeads donne une baisse d'environ 50% ; de plus le rapport massique Lapao-lipides est proche de 3, la diminution attendue en concentration totale du mélange Lapao-lipides est donc de $50\% \cdot 3/4 = 35\%$. . . Plus qu'une valeur soumise à de nombreuses approximations, gardons à l'esprit la diminution qualitative du nombre de franges.

La deuxième différence est une légère modification de la sédimentation :

⁸Les courbes d'ultracentrifugation analytique sont directement des copies d'écran de Sedfit. En effet ces copies sont de qualité suffisante pour appréhender les données. J'ai choisi de ne pas améliorer l'esthétique de ces figures dont la réalisation est *très* chronophage. J'espère en être excusé. Une « vraie » figure récapitulative est néanmoins proposée à la fin de cette section.

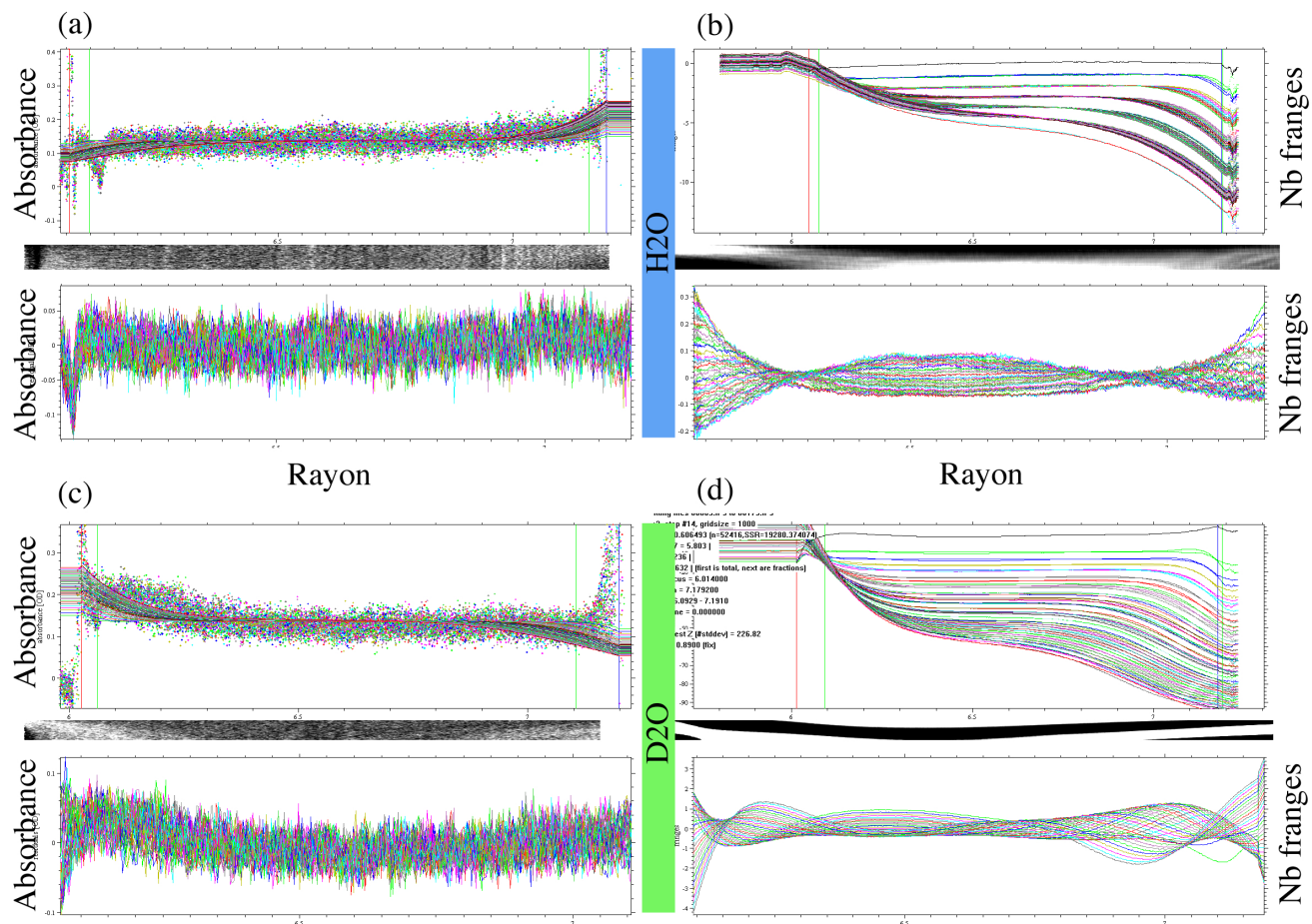


FIG. 2.8 – **Sédimentation du Lapao en H_2O et D_2O .** La concentration du Lapao est de 5% (p/v). **(a)** Profils d'absorbance à 280 nm (données brutes, modélisées et résidus) en tampon hydrogéné. **(b)** Profils d'interférence (données brutes, modélisées et résidus) en tampon hydrogéné. **(c)** Profils d'absorbance à 280 nm (données brutes, modélisées et résidus) en tampon deutéré. **(d)** Profils d'interférence à 280 nm (données brutes, modélisées et résidus) en tampon deutéré. La modélisation des profils est indépendante pour chaque panneau. (a) et (b) sédimentation de 18 heures, (c) et (d) sédimentation de 23 heures. Le trajet optique est de 3 mm.

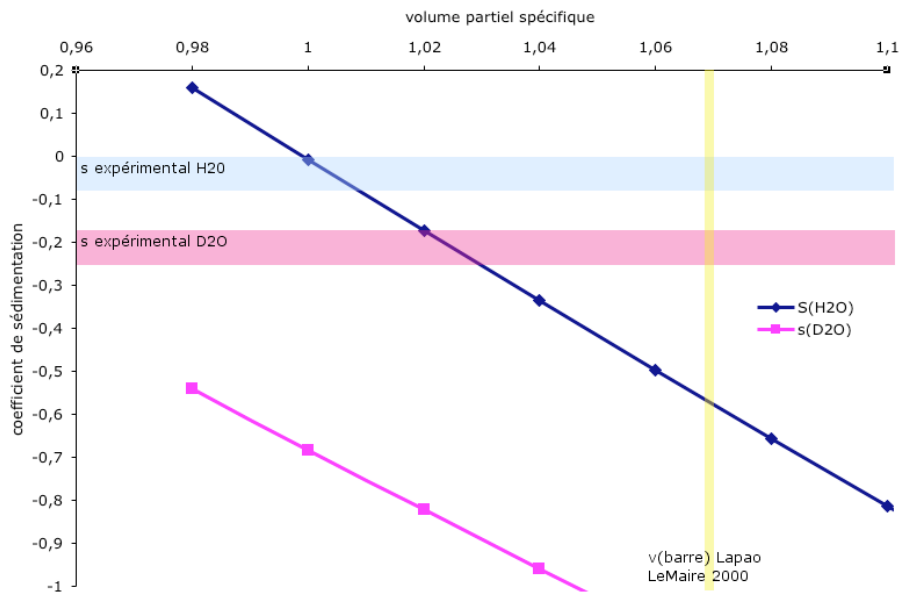


FIG. 2.9 – **Volume partiel spécifique du Lapao.** Les zones bleues et rouges représentent la valeur de s donnée par l'expérience dans les tampons H_2O et D_2O respectivement. Les courbes bleues et rouges représentent les valeurs théoriques de s calculées pour une micelle sphérique avec un nombre d'agrégation de 125 (source : catalogue Anatrace) pour ces mêmes tampons. Enfin le trait jaune donne la valeur de \bar{v}_d issue de la littérature. L'expérience en H_2O est en accord avec le calcul pour une valeur $\bar{v}_d \simeq 1 \text{ mL/g}$; en D_2O par contre, cette valeur doit être plus petite car il n'y a pas d'intersection entre la courbe et la zone rouge. Néanmoins une modélisation globale des deux expériences aboutit à $\bar{v}_d \simeq 1$, et déforme la micelle. La meilleure interprétation possible semble de dire que la courbe rouge ne représente qu'un modèle possible de la micelle, et qu'il existe une zone l'entourant également acceptable, compte-tenu des hypothèses (sur le facteur f/f_0) et de la précision sur les paramètres (sur N_{ag}) utilisés pour son calcul.

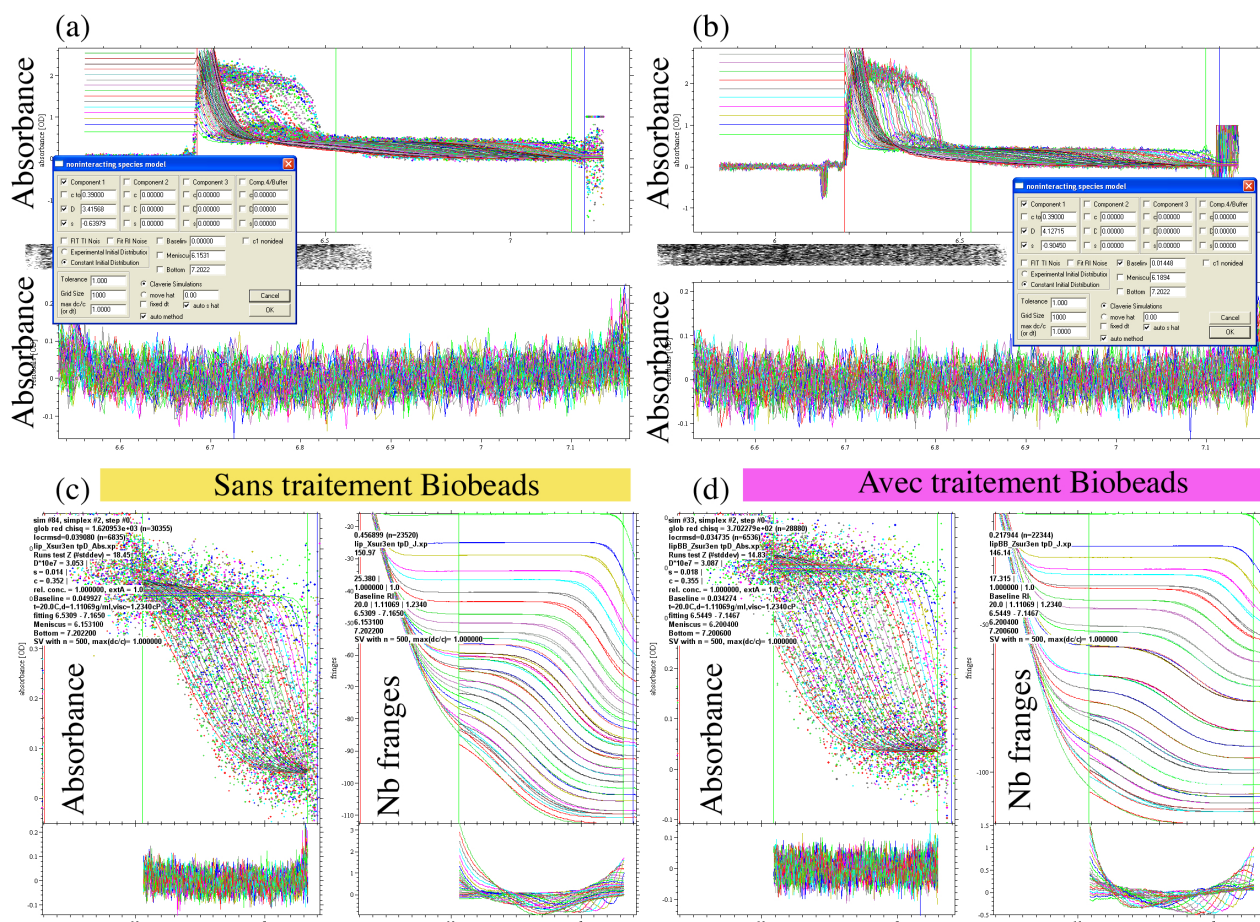


FIG. 2.10 – **Sédimentation des échantillons « à l'identique » en D₂O.** (a) Profils d'absorbance à 280 nm (données brutes, modélisées et résidus) pour un échantillon non traité aux Biobeads. (b) Profils d'absorbance pour un échantillon traité aux Biobeads. (c) Modélisation globale des profils d'absorbance et d'interférence pour un échantillon non traité aux Biobeads. (d) Modélisation globale des profils d'absorbance et d'interférence pour un échantillon traité aux Biobeads. (a) et (c) sédimentation de 21 heures, (b) et (d) sédimentation de 24 heures. Le trajet optique est de 3 mm.

	Mélange Lapao-lipides		Lapao
	Biobeads	\emptyset	
s_{20°	-1,07	-0,75	-0,3
s_{10°	-0,8	-0,56	-0,3
A_{tot}	0,35	0,35	0,12
J_{tot}	17,3	25,4	29
J/A	49	73	233
c	29	42	50
\bar{v}	1,011	0,977	1,002

TAB. 2.4 – **Résultats expérimentaux pour les mélange lipides-détergent et pour le Lapao dans le tampon D₂O.** Les chiffres en italique ont nécessité un calcul, et souvent une hypothèse. Rappel : les mesures ont eu lieu à 20°C pour les mélanges Lapao-lipides et à 10°C pour le Lapao seul.

les particules flottent un peu plus après traitement par Biobeads. Ce surcroît de flottaison peut s'expliquer soit par des particules plus petites, soit par des particules moins denses. La différence de volume partiel spécifique calculé pour une micelle compacte globulaire est de 0,034 mL/g (dernière ligne du tableau).

Signal parasite et impureté Le signal parasite présent à proximité du ménisque signale la présence d'une impureté dans nos échantillons. Celle-ci est également mise en évidence lors de la migration de l'échantillon au sein d'un gradient de saccharose (comparer l'absorbance et le contenu protéique des fractions du haut du tube dans la figure de la page 102). Cette impureté est un composé lipophile puisqu'il s'intègre aux micelles ; qui absorbe à 280 nm mais ne présente pas de spectre de fluorescence caractéristique. Il pourrait participer à hauteur de 15% environ à l'absorbance à 280 nm de nos échantillons.

Toutefois un artefact optique pourrait également intervenir dans cette zone proche du ménisque.

2.2.3 Sédimentation du complexe membranaire bAAC1-Lapao-lipides

Dans le tampon hydrogéné, le complexe protéique sédimente clairement, et cette sédimentation est en accord avec un modèle à une espèce idéale (figure 2.11). Les micelles de lipides et de détergent qui ne contiennent pas de protéine ne sédimentent pas significativement et apparaissent comme une ligne de base.

Dans le tampon deutéré on observe une flottaison du complexe protéique, qu'on ne peut pas distinguer de la flottaison des micelles non-protéiques (figure 2.12). On a accès uniquement à une estimation de s .

2.2.3.1 Sédimentation en tampon H₂O

Sur cet échantillon on a réalisé une analyse, en général très performante, en distribution de taille de particules. On obtient des résultats comparables en l'absence ou avec un traitement par Biobeads des échantillons : $s \simeq 1,06$ S, $D \simeq 4,2$ F. Ces résultats sont donnés dans le tableau 2.5.

	bAAC1-lipides-Lapao en H ₂ O		bAAC1-lipides-Lapao en D ₂ O	
	Biobeads	∅	Biobeads	∅
s_{10°	1,07	1,036	[−0,2 − 0,1]	
D	4,4	4	non déterminé	
J/A	5,3	5,1		

TAB. 2.5 – Résultats expérimentaux pour les complexes protéine-lipides-détergent dans les tampon H₂O et D₂O.

Le ratio du signal d'interférence par rapport au signal d'absorbance caractérise les espèces associées à la protéine dans le complexe membranaire. En effet le nombre de franges d'interférence J dépend de l'incrément d'indice de réfraction lors de la mise en solution d'un composé quel qu'il soit : $J \propto \frac{\partial n}{\partial c} \cdot c$. En d'autres termes, J « voit » l'ensemble des espèces alors que A_{280} ne « voit » que la protéine. Ce ratio est de 7,23 franges par milligramme de protéine par millilitre. Le ratio attendu pour une protéine seule est de 2,76, on a donc un excès de 4,5 franges environ. **Cet excès correspond à une quantité de détergent et de lipides liés B entre 1,6 et 2,2 grammes par gramme de protéine** (suivant que l'on utilise le $\frac{\partial n}{\partial c}$ de la protéine ou du C₁₂E₈ pour le Lapao et les lipides).

L'interprétation de D en termes de paramètres de la particule (équation 2.2) donne un **rayon hydrodynamique** de 38 ± 2 Å. Par le calcul, pour un complexe liant environ 2 grammes de lipides et de détergent par gramme de protéine, avec un volume partiel spécifique du mélange \bar{v}_{d+l} proche de 1 mL/g, et si la particule est globulaire compacte, on obtient un rayon de 41 et 52 Å pour le monomère et le dimère respectivement.

En utilisant s et D , on obtient une **masse flottante du complexe** M_B de $6 \pm 0,3$ kDa. Le calcul avec les hypothèses précédentes donne une valeur de 8,4 et 16,8 kDa pour le monomère et le dimère respectivement.

Dans les deux cas le modèle monomérique est donc le plus favorable.

2.2.3.2 Flottaison en tampon D₂O

Dans cette expérience, il y a flottaison à la fois du complexe protéique et des micelles non protéiques. Ceci a une double conséquence : d'une part on observe la formation d'une zone de forte absorption près du ménisque ; d'autre part il est malaisé de séparer les signaux de ces deux types de particules. On parvient simplement à obtenir une estimation de s qui est compris dans l'intervalle [−0,2 − 0,1] S.

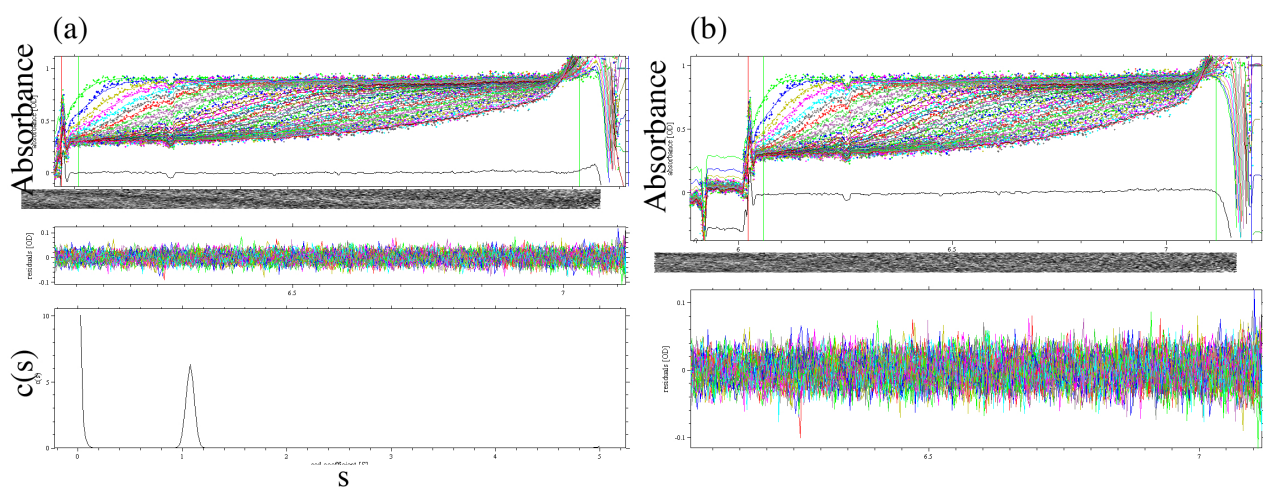


FIG. 2.11 – **Sédimentation du complexe protéique en H_2O .** (a) Profils d'absorbance à 280 nm (données brutes, modélisées et résidus) et analyse en distribution $c(s)$ pour l'échantillon traité aux Biobeads. (b) Profils d'absorbance et analyse dans le cadre d'un modèle à une espèce non interagissante pour le même échantillon. Durée de la sédimentation : 18 heures. Le trajet optique est de 3 mm.

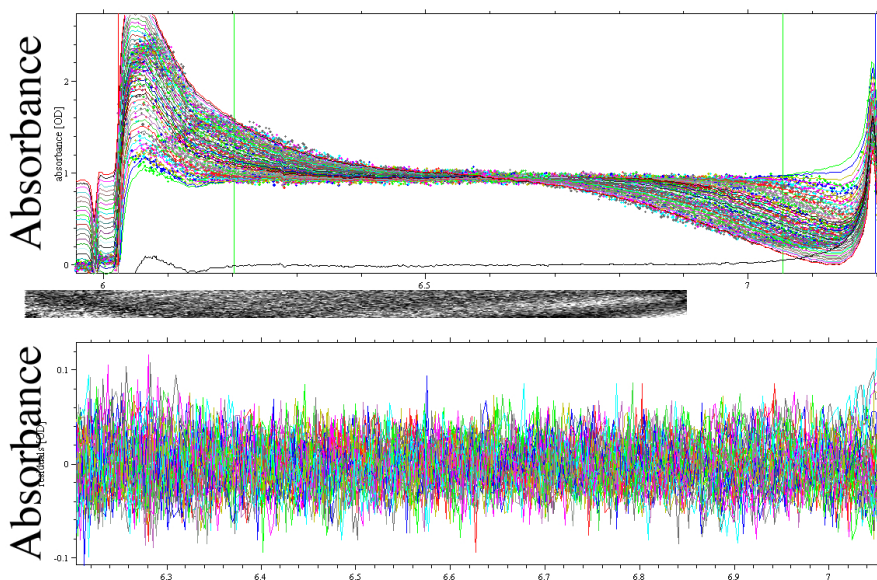


FIG. 2.12 – **Sédimentation du complexe protéique en D_2O** . La coordonnée en abscisse est le rayon dans le tube de centrifugation en cm.

2.2.3.3 La protéine est monomérique

A partir de la valeur expérimentale du coefficient de sédimentation s , et des autres données du problème, on peut calculer les couples (\bar{v}_{d+l}, B) qui sont solutions de l'équation [2.3].

On obtient un ensemble de valeurs (\bar{v}_{d+l}, B) qui forment une courbe dans le plan. Lorsque l'un des paramètres varie, la courbe change, et il donc pertinent d'en dessiner plusieurs. La figure 2.13 présente les courbes extrêmes qui correspondent aux valeurs limites acceptables des paramètres s et f/f_0 . La région située entre ces courbes extrêmes est celle dans laquelle les couples (\bar{v}_{d+l}, B) correspondent à l'expérience.

Comme nous avons réalisé une expérience en tampon hydrogéné et une en tampon deutéré, nous pouvons dessiner ces courbes simultanément pour les deux expériences, dans l'hypothèse d'une protéine monomérique (panneau A) ou dimérique (panneau B). Dans le premier cas, l'intersection entre les régions solution dans H_2O et D_2O existe : les deux expériences sont compatibles avec un même ensemble de valeurs de (\bar{v}_{d+l}, B) . Dans le deuxième cas à l'inverse, cette intersection est vide : les deux expériences ne sont pas compatibles. Comme elles

ont été réalisées avec la même protéine, c'est donc l'hypothèse du dimère qui est fausse.

Ce résultat vient appuyer ceux du paragraphe précédent qui donnait un rayon hydrodynamique du complexe et une masse flottante compatible avec un monomère. **Ainsi, nos expériences prouvent que bAAC1 est monomérique en solution dans les conditions testées** – aussi proches que possible de celles de la cristallisation.

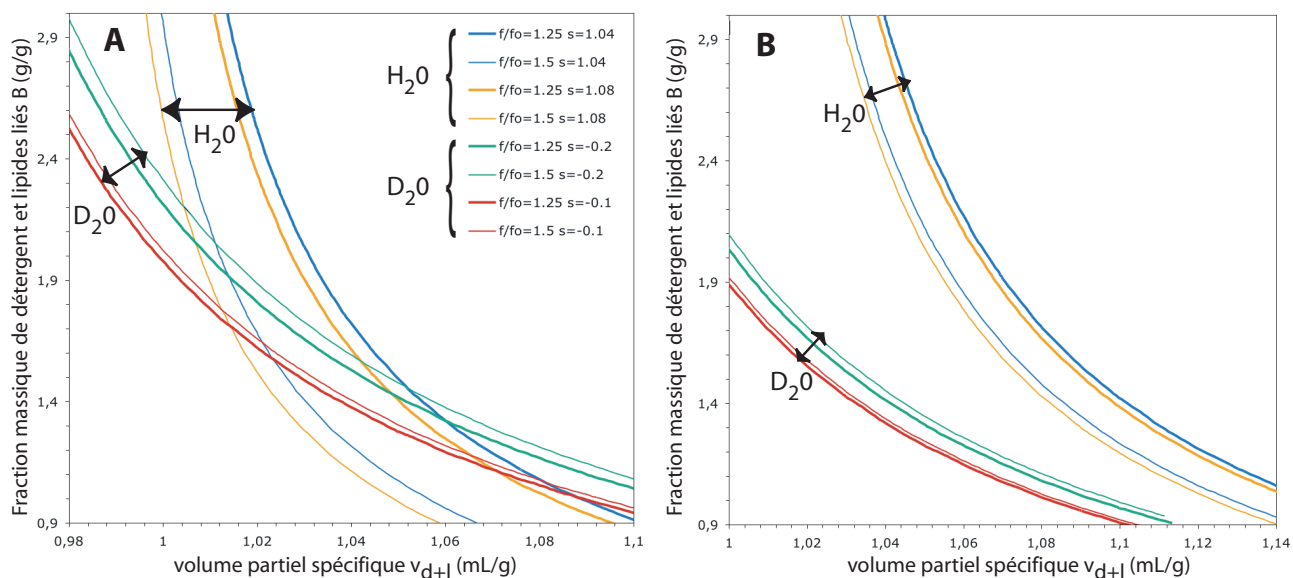


FIG. 2.13 – Les expériences sont compatibles avec un monomère et pas avec un dimère. Les couples acceptables des paramètres (\bar{v}_{d+l} , B) sont compris dans la région délimitée par les différentes courbes. En trait fin celles paramétrées par $f/f_0=1,5$, en trait épais par $f/f_0=1,25$. Les courbes les plus à gauche correspondent au tampon D_2O , celles de droite au tampon H_2O , et on a également dessiné une courbe pour chaque valeur extrême de $s = 1,06 \pm 0,02$ en H_2O et $s = -0,15 \pm 0,05$ en D_2O . L'intersection existe en **A** pour le monomère, mais pas en **B** pour le dimère.

Détails techniques Ce paragraphe apporte des précisions sur la manière de déterminer les couples solutions, sa lecture n'est pas nécessaire en première instance.

On remplace par leurs valeurs la masse flottante M_B et le rayon hydrodynamique R_H dans l'équation (2.3) pour obtenir :

$$s = \frac{M(1 - \rho\bar{v}_p) + MB(1 - \rho\bar{v}_{d+l})}{6\pi N_a \eta \frac{f}{f_0} \sqrt[3]{\frac{3}{4\pi N_a} (Mv_p + MBv_{d+l})}} \quad (2.7)$$

Les inconnues auxquelles on s'intéresse sont (\bar{v}_{d+l}, B) . Les autres inconnues sont données par la mesure ou le calcul, et paramétrisent l'équation. Cette équation se ramène à un polynôme de degré trois en (\bar{v}_{d+l}, B) , dont des solutions analytiques peuvent donc être trouvées.

Plus simplement pour réaliser les courbes de la figure 2.13, on utilise un logiciel de calcul formel comme *Maple* qui permet de tracer des fonctions implicites (B est une fonction implicite de \bar{v}_{d+l} , c'est-à-dire qu'il existe une relation liant ces deux termes, mais qu'on ne peut pas écrire d'expression simple du type $B = f(\bar{v}_{d+l})$). Le logiciel procède à une évaluation numérique dans une plage de valeurs donnée, grâce à la commande *implicitplot*.

2.2.4 Figure récapitulative

La figure 2.14 montre les courbes représentatives de nos expériences avec le mélange Lapao-lipides et avec le complexe protéique. Tous les panneaux sauf le panneau A ont déjà été représentés, il s'agit simplement ici d'illustrer nos résultats de manière synthétique.

Les micelles mixtes contribuent comme une ligne de base en H_2O (panneau A) et flottent faiblement en D_2O (panneau B). En D_2O , une zone d'artefact optique (et lié à la présence d'un contaminant) est exclue près du ménisque.

Le complexe protéique sédimente en H_2O et l'analyse de la distribution de s montre la présence d'une unique espèce (panneaux C). Le complexe protéique et les micelles flottent faiblement en D_2O (panneaux D).

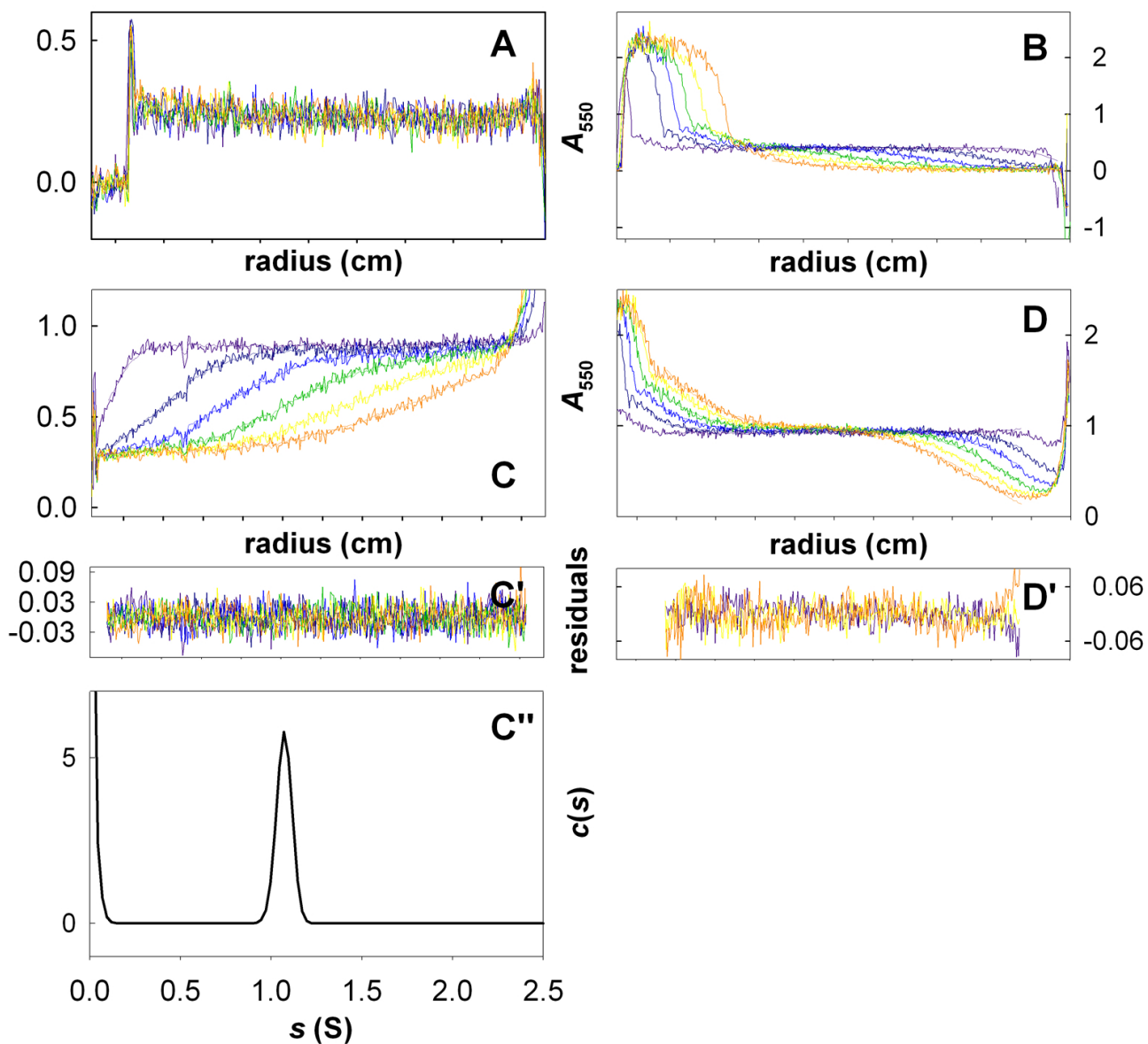


FIG. 2.14 – **Résumé des expériences de sédimentation de vitesse.** **A** Mélange de Lapao et de lipides « à l'identique » dans un tampon hydrogéné. **B** Mélange de Lapao et de lipides « à l'identique » dans un tampon deutéré. **C** Complexe protéique en tampon hydrogéné. **C'** Résidus de la modélisation à une espèce non interagissante **C''** Analyse de la distribution en s pour le complexe protéique en tampon hydrogéné. **D** Complexe protéique en tampon deutéré. **D'** Résidus de la modélisation à une espèce non interagissante. Toutes les courbes correspondent à des échantillons traités aux Biobeads. Pour la clarté de la figure, seules six courbes réparties le long des 20 heures d'expériences sont représentées.

2.3 Diffusion de neutrons aux petits angles

La diffusion d'un flux de neutrons par un complexe membranaire en solution peut permettre de connaître son état oligomérique. En effet, l'interprétation des données aux petits angles donne accès à la masse des particules, et à leur rayon de giration. Nous avons réalisé une unique série d'expériences pendant l'été 2004, avec les mêmes échantillons que ceux analysés en ultracentrifugation analytique. Nos données sont plutôt en accord avec un modèle monomérique ; elles mettent en lumière la difficulté de mise en oeuvre des méthodes de variation de contraste dans un mélange complexe protéine-détergent-lipides.

Ces expériences sont le fruit d'une collaboration avec Joseph Zaccai et Christine Ebel.

2.3.1 Principe

2.3.1.1 Production de neutrons

Les sources de neutrons peuvent être de deux types. Ce sont soit des sources à spallation, dans lesquelles les neutrons sont expulsés (le mot anglais *spalled* signifie délité) de noyaux d'éléments lourds bombardés par des particules de haute énergie ; soit comme à l'Institut Laue Langevin de Grenoble, des réacteurs nucléaires.

Dans le cœur de ces derniers se produit une réaction en chaîne de fission de l'élément ^{235}U : l'absorption d'un neutron par un atome d'uranium entraîne la fission de cet atome et la production de deux à cinq neutrons. Les neutrons utilisables ont une énergie cinétique de l'ordre de 2 MeV.

Si on décrit en termes ondulatoires le flux de neutrons, on peut lui associer la longueur d'onde λ telle que⁹ :

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{\sqrt{2mE}} \quad (2.8)$$

car l'énergie du neutron non relativiste est uniquement cinétique et s'écrit $E = \frac{p^2}{2m}$. Pour sonder la matière, cette longueur d'onde λ doit être de l'ordre de l'angström ; compte-tenu des valeurs de h et m , l'énergie des particules doit donc être de l'ordre du milliélectronvolt ($1,6 \cdot 10^{-22}\text{J}$).

En conséquence, il faut donc diminuer l'énergie des neutrons dans le réacteur – d'un facteur 10^8 ! – : c'est le rôle du modérateur. L'eau ou l'eau lourde peuvent servir de modérateur. Les neutrons peuvent également acquérir une énergie donnée par un mécanisme dit de thermalisation : placés au contact d'une source à température constante T , leur énergie suit une loi de distribution de Maxwell-Boltzmann fonction de cette température : $E = 3/2 k_B T$. On parle ainsi de neutrons froids (mis au contact d'hydrogène liquide à 20 K, de longueur d'onde associée $\lambda > 10 \text{ Å}$) ou de neutrons chauds (mis au contact de graphite à 2000 K,

⁹ p est la norme de la quantité de mouvement, m la masse d'un neutron, E son énergie et h la constante de Planck. Les valeurs de h et m sont : $h = 6,63 \cdot 10^{-34} \text{ m}^2\text{s}^{-1}\text{kg}$ et $m = 1,67 \cdot 10^{-27}\text{kg}$.

de longueur d'onde associée $\lambda < 0,3 \text{ \AA}$). Pour nos expériences, nous avons utilisé un flux monochromatique de longueur d'onde $\lambda = 10 \text{ \AA}$.

2.3.1.2 Interaction des neutrons avec la matière

Bien que fondamentalement différentes, les interactions entre les rayons X et la matière d'une part, entre les neutrons et la matière d'autre part, peuvent être décrites avec le même formalisme. Dans les deux cas on peut définir une longueur de diffusion b pour chaque élément. Cette longueur caractérise l'interaction entre le rayonnement et l'atome considéré : son carré est proportionnel à la probabilité qu'une particule du flux soit diffusée.

Pour les rayons X qui interagissent avec le cortège électronique, cette longueur de diffusion s'écrit $b_X = N_e r_0$ où N_e est le nombre d'électrons de l'atome considéré et $r_0 = 2,82 \cdot 10^{-13} \text{ cm}$ le rayon de Thomson. Le facteur de diffusion croît alors avec le numéro atomique. Pour les neutrons, qui interagissent avec le noyau des atomes, **la longueur de diffusion n'augmente pas avec le numéro atomique, et elle varie suivant l'isotope considéré**. Ces différences, illustrées par la table 2.6, sont à l'origine de la complémentarité des deux techniques : les neutrons sont plus sensibles que les rayons X aux éléments légers ; la différence de longueur de diffusion entre l'hydrogène et le deutérium donne accès aux méthodes de variation de contraste.

Atome	H	D	C	N	O	P	S	Au
Masse atomique	1	2	12	14	16	30	32	197
Nb d'électrons	1	1	6	7	8	15	16	79
$b_X, 10^{-12} \text{ cm}$	0,282	0,282	1,69	1,97	2,16	3,23	4,51	22,3
$b_N, 10^{-12} \text{ cm}$	-0,374	0,667	0,665	0,940	0,580	0,510	0,280	0,760

TAB. 2.6 – **Longueurs de diffusion des rayons X et des neutrons de quelques éléments.** Source : Koch et al. [2003].

2.3.1.3 Diffusion par une solution de macromolécules

Les références [Jacrot, 1976, Jacrot et Zaccaï, 1981, Koch et al., 2003, Lairez et Pelta, 2004] sont utiles pour se familiariser avec la description formelle de la diffusion de neutrons par une solution biologique.

On peut définir la densité de longueur de diffusion $\rho(\mathbf{r})$ comme la longueur de diffusion totale par unité de volume des atomes d'une macromolécule de volume V :

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \int_V b(\mathbf{x}) d\mathbf{x} = \frac{1}{V} \sum_{\text{atomes } i} b_i \quad (2.9)$$

suivant qu'on adopte un formalisme de milieu continu (plus couramment utilisée pour les rayons X) ou discret. En considérant le solvant comme un

milieu uniforme de densité de diffusion constante ρ_s , la différence d'amplitude diffusée entre la solution de macromolécules et le solvant s'écrit :

$$A(\mathbf{q}) = TF[\rho(\mathbf{r}) - \rho_s] = \int_V (\rho(\mathbf{r}) - \rho_s) e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{r}, \quad (2.10)$$

où \mathbf{q} est le vecteur de diffusion à l'angle 2θ , de norme $q = \sin(\theta) \frac{4\pi}{\lambda}$. L'observable physique expérimental est l'intensité diffusée par l'assemblée des N particules en solution, soit :

$$I(\mathbf{q}) = \sum_N A(\mathbf{q}) \left[\sum_N A(\mathbf{q}) \right]^*. \quad (2.11)$$

Cette relation se décline différemment lorsqu'on l'applique aux deux cas particuliers rencontrés dans l'étude des protéines. Dans le premier cas, la cristallographie, nos échantillons sont constitués de particules identiques, organisées en un mono-cristal et donc orientées et distribuées de façon régulière. Les interférences interparticulaires sont alors constructives. Dans le deuxième cas, celui qui nous intéresse ici, les particules sont toujours identiques mais placées en solution. Si la solution est suffisamment diluée et isotrope, on se place dans l'approximation de Debye où les particules n'interagissent pas entre elles et où leurs orientations sont aléatoires. L'intensité totale est alors simplement égale à N fois l'intensité diffusée par une particule, moyennée sur toutes les orientations possibles :

$$I(\mathbf{q}) = N \langle A(\mathbf{q}) A^*(\mathbf{q}) \rangle = N \left\langle \left| \int_V (\rho(\mathbf{r}) - \rho_s) e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{r} \right|^2 \right\rangle. \quad (2.12)$$

2.3.1.4 Approximation de Guinier, rayon de giration, masse particulaire

La relation précédente peut tout aussi bien s'écrire :

$$I(\mathbf{q}) = N \left\langle \int_V \int_V \Delta\rho(\mathbf{r}) \Delta\rho(\mathbf{r}') e^{i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}')} d\mathbf{r} d\mathbf{r}' \right\rangle, \quad (2.13)$$

avec $\Delta\rho(\mathbf{r})$ la différence de densité de longueur de diffusion entre la particule et le solvant. Connaissant l'expression de la moyenne d'une exponentielle complexe : $\langle e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} \rangle = \frac{\sin(qr)}{qr}$, et en intégrant en coordonnées sphériques, on peut dissocier l'exponentielle du terme en $\Delta\rho$ pour obtenir :

$$I(q) = 4\pi N \int_0^{D_{max}} r^2 \gamma(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr, \quad (2.14)$$

où

$$\gamma(r) = \left\langle \int \Delta\rho(\mathbf{u}) \Delta\rho(\mathbf{u} + \mathbf{r}) d\mathbf{u} \right\rangle. \quad (2.15)$$

Cette dernière fonction est la moyenne de la fonction d'autocorrélation de l'excès de densité apporté par la particule. Elle peut être reliée à la distribution des distances pondérée par l'excès de densité, qui est d'usage fréquent [Koch et al., 2003] et permet d'obtenir l'enveloppe de la particule, mais ne nous concerne pas ici.

Aux petits angles, dans le domaine dit de Guinier, on peut utiliser le développement limité $\frac{\sin(qr)}{qr} = 1 - (qr)^2/3! + o(q^2)$ pour obtenir finalement une expression de la forme :

$$I(q) = I(0) \left[1 - \frac{(qR_g)^2}{3} + o(q^2) \right] \sim I(0) \cdot e^{-\frac{(qR_g)^2}{3}} \quad (2.16)$$

Cette relation, introduite initialement en 1955 par Guinier et Fournet, est fondamentale pour l'interprétation des données de diffusion de neutrons. En effet, on peut tracer à partir des intensités enregistrées un graphique $\ln(I(q)) = f(q^2)$, linéaire dans le domaine de Guinier, dont l'ordonnée à l'origine $I(0)$ et la pente $-R_g^2/3$ sont directement dépendants des paramètres de la particule.

Regardons cette dépendance de plus près. Nous allons admettre ici que le paramètre R_g de l'expression précédente s'identifie avec le rayon de giration de la particule, et donne donc une information sur sa forme. R_g est la moyenne des distances quadratiques pondérées par les longueurs de diffusion des centres diffusants, par analogie avec la mécanique on l'écrit :

$$R_g^2 = \frac{\sum \Delta b_i r_i^2}{\sum \Delta b_i}, \quad (2.17)$$

Le lecteur intéressé ou/et particulièrement courageux pourra se plonger dans les articles de Koch et al. [2003] ou Lairez et Pelta [2004] qui expliquent cette identification¹⁰.

De la même manière, nous admettons que le paramètre $I(0)$ est proportionnel à la masse particulaire. On peut en avoir l'intuition grâce à la relation 2.14, dans laquelle les premiers termes avant $\frac{\sin(qr)}{qr}$ vont s'intégrer pour donner une relation du type :

$$I(0) \propto N \cdot V^2 \cdot (\Delta\rho)^2 \quad (2.18)$$

Or tant le nombre de particules (à concentration fixée) que le volume d'une particule dépendent de leur masse : $N \propto cM_p^{-1}$ et $V \propto M_p$. On comprend donc que $I(0)$ est proportionnel à $cM_p(\Delta\rho)^2$: il y a bien une relation linéaire entre $I(0)$ et la masse particulaire.

¹⁰l'article de Lairez, écrit en français, utilise un formalisme discret un peu rébarbatif mais qui finalement rend limpide l'introduction de R_g

Jacrot et Zaccaï [1981] proposent une expression de cette quantité $I(0)$:

$$I(0) = \frac{cM_p}{N_a} \cdot \frac{4\pi f T_e t}{1 - T_{eau}} \cdot \left(\sum_{\text{atomes}} b_i - \rho \bar{v} \right)_g^2 \quad (2.19)$$

Explication des différents termes :

$\frac{cM_p}{N_a}$	$\frac{4\pi f T_e t}{1 - T_{eau}}$	$\left(\sum b_i - \rho \bar{v} \right)_g^2$
La masse M_p est déterminée pour une concentration c connue	Terme dépendant de la géométrie expérimentale	Excès p/r au solvant de longueur de diffusion
Attention aux indices! M_p est ici la masse particulaire et pas la masse de la protéine	f facteur multiplicatif; T_e (T_{eau}) intensité transmise par l'échantillon (l'eau); t longueur du chemin optique	$\sum b_i$ obtenu grâce à la séquence et à la composition de la particule

2.3.1.5 Variation du contraste

L'idée qui sous-tend notre utilisation des méthodes de variation du contraste est simple : adapter le contenu isotopique (le rapport entre deutérium et hydrogène) du tampon permet de s'affranchir de son signal de diffusion et de faire ressortir uniquement le signal de la particule d'intérêt.

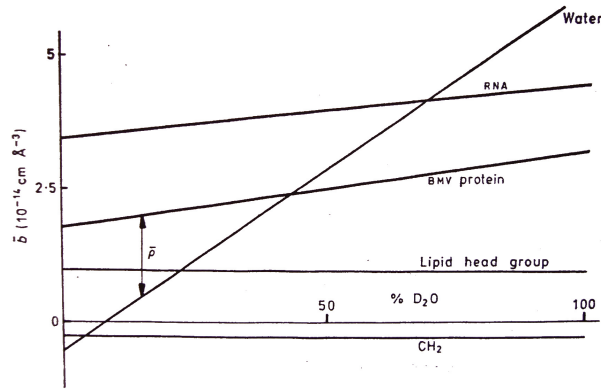


FIG. 2.15 – **Densités de longueurs de diffusion moyennes pour quelques composants biologiques.** Les courbes dépendent de la fraction d'hydrogène échangé, du volume spécifique des molécules considérées. Elles donnent néanmoins une notion visuelle du *matching point*, qui est l'abscisse du point d'intersection entre la courbe du solvant et du composant.

La figure 2.15, illustre cette idée. On observe en effet que la courbe de densité moyenne de diffusion de l'eau intercepte celles d'une protéine, d'un acide nu-

cléique, pour des ratios spécifiques entre hydrogène et deutérium. Si on effectue une mesure de diffusion à cette valeur du ratio, appelée couramment *matching point* ou point d'annulation des contrastes, alors la différence entre le densité de diffusion moyenne d'une particule et celle du solvant est nulle. On a :

$$\langle \rho(\mathbf{r}) \rangle - \rho_s = \frac{1}{V} \sum_{\text{atomes } i} b_i - \rho_s = 0 \quad (2.20)$$

La variation de contraste est donc un bon outil pour obtenir des informations sur un élément unique d'un mélange complexe en annulant la contribution des autres constituants. Dans notre cas, on souhaite faire ressortir le complexe protéine-lipides-détergent. Le mélange contient également de nombreuses micelles sans protéines ainsi qu'une faible concentration de détergent monomérique. Si on se place au *matching point*, et dans la limite de particules qui n'interagissent pas, tout se passe comme si on observait uniquement la diffusion du complexe protéine-lipides-détergent. On peut alors décrire les données dans le cadre d'un modèle à une seule espèce.

Il est intéressant de noter que les méthodes de variations de contrastes peuvent aussi renseigner sur la structure interne des particules [Timmins et al., 1994b].

2.3.2 Dispositif expérimental – traitement des données

2.3.2.1 Préparation des échantillons

Les échantillons utilisés sont les mêmes qu'en ultracentrifugation analytique (voir le paragraphe 2.2.1.3 page 42). Pour tous les échantillons, on réalise des mélanges aux ratios 0% 40% 60% et 100% entre l'échantillon hydrogéné et celui deutéré.

Quant cela est nécessaire, la concentration protéique précise des échantillons est déterminée par microanalyse en acides aminés après hydrolyse acide.

2.3.2.2 Enregistrement et traitement des données

Les expériences ont eu lieu sur la ligne D22 de l'ILL. Pendant un enregistrement de durée comprise entre 1 et 5 heures, des cuvettes en quartz de 1 mm de trajet optique contenant 150 μL de solution sont maintenues à 4°C.

Les intensités diffusées sont enregistrées sur un détecteur bi-dimensionnel placé à une distance de 4 ou 5,6 m. Le centre du détecteur est déterminé, puis on applique un masque sur les images de diffusion pour éliminer les pixels cachés par le *beamstop*, et pour éliminer une zone défaillante du bord du détecteur. On intègre ensuite radialement les images. L'intensité est enfin normalisée par la diffusion de l'eau, ce qui permet de comparer différentes mesures entre elles :

$$I_{norm} = \frac{I_{ech} - t_{ech}I_{vide}}{I_{eau} - t_{eau}I_{vide}} - \langle I \rangle_{Q \text{ grand}} \quad (2.21)$$

avec t_{ech} (respectivement t_{eau}) le coefficient de transmission de l'échantillon (respectivement l'eau), et où les intensités sont indicées par le contenu de la cuve. Le terme $\langle I \rangle_{Q_{grand}}$ correspond à la diffusion incohérente par le tampon. Au *matching point*, il est normalement équivalent de soustraire ce terme ou une expression du type $\frac{I_{tampon} - t_{tampon} I_{vide}}{I_{eau} - t_{eau} I_{vide}}$. Nous avons utilisé ces deux possibilités, les valeurs numériques que je donne sont les valeurs moyennes de l'une et l'autre.

Les représentations de Guinier sont réalisées à l'aide des logiciels de l'ILL, qui donnent une valeur de $I(0)$, de R_g , et de la qualité de la régression linéaire.

2.3.3 Résultats

2.3.3.1 Détermination du point d'annulation des contrastes

Dans notre cas, déterminer le *matching point* est un préliminaire à l'enregistrement de données de diffusion interprétables. C'est une opération facile à réaliser, délicate toutefois car elle conditionne la validité des résultats en aval. Je trouve donc utile de la décrire ici, d'autant que nous avons longtemps estimé que nos données étaient sans valeur, trop imprécises, à cause d'une détermination approximative du *matching point*.

Intensité transmise et contenu isotopique La norme de l'intensité transmise à travers un échantillon est proportionnelle au carré de sa densité de longueur de diffusion moyenne : $I_t \sim |A|^2 \propto \langle \rho \rangle^2$. Comme cette densité dépend linéairement du rapport entre hydrogène et deutérium, on peut sur un graphique $\ln(I_{Trans}) = f([D_2O]/[H_2O])$ déterminer le contenu isotopique d'un échantillon à partir de l'enregistrement de l'intensité qu'il transmet. Nous avons réalisé cette mesure pour plusieurs séries d'échantillons : le tampon, une solution de Lapao à 17% m/v et des échantillons « à l'identique » ressemblant aux échantillons protéiques, mais dépourvus de protéine. Chaque série regroupe quatre tubes similaires contenant respectivement 0% 40% 60% et 100% de D_2O .

La figure 2.16 montre que la deutération de nos échantillons est en réalité plus faible qu'attendue. Il y a là une certaine logique. En effet les échantillons sont préparés par solubilisation de matériel solide hydrogéné dans D_2O , ce qui limite obligatoirement le taux maximum de deutération. Par exemple dans l'échantillon det100, préparé par dissolution de 170 mg/ml de détergent Lapao, il y a au moins 15% d'hydrogène. De plus le tampon utilisé pour les dissolutions ou les dialyses n'est composé qu'à 95% de D_2O . Enfin il faut tenir compte de l'échange pendant le déroulement de l'expérience.

A l'aide de ces premières mesures en transmission, nous obtenons les valeurs réelles du contenu en deutérium des échantillons « à l'identique », qui servent pour de la détermination du *matching point*.

Détermination graphique du *matching point* Pour la série d'échantillons « à l'identique », censés contenir tous les composants du mélange sauf la protéine, une mesure de diffusion est enregistrée à une distance de 1,5 m. Le *mat-*

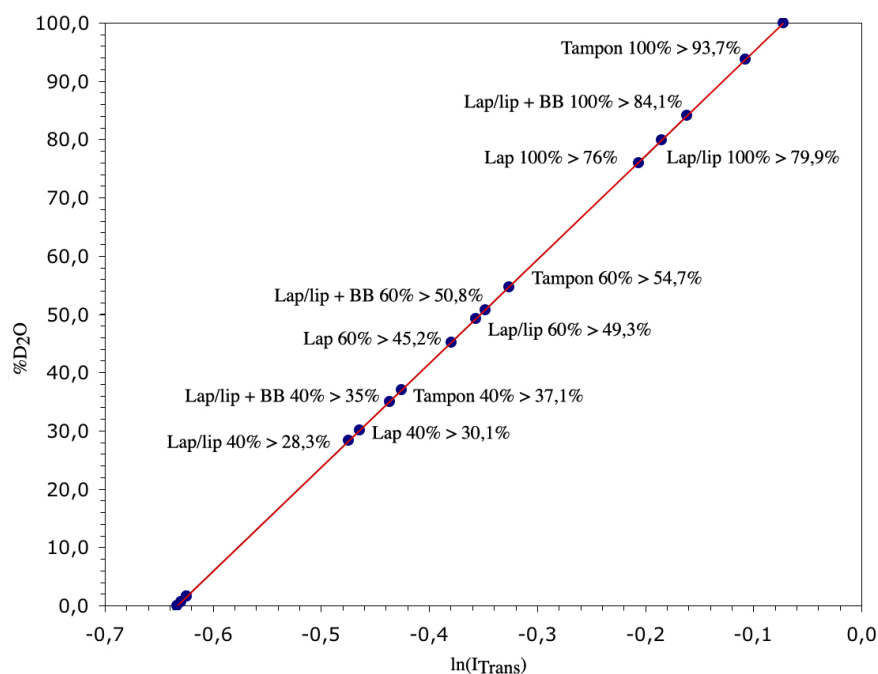


FIG. 2.16 – **Détermination de la deutération des échantillons par transmission.** Chaque point correspond à une mesure de transmission (en abscisse) pour laquelle on lit alors le taux réel de deutération (en ordonnée). Le taux attendu et le taux mesuré sont donnés sur le graphique, pour les séries d'échantillons de tampon, de détergent (Lap), et de mélange Lapao-lipides (Lap/lip).

ching point est déterminé graphiquement, à l'intersection de trois droites. Ces droites sont $\sqrt{\frac{I_{max}}{I_{trans}}} = f(\frac{[D_2O]}{[H_2O]})$, $\sqrt{\frac{\int I}{I_{trans}}} = f(\frac{[D_2O]}{[H_2O]})$ et l'axe des abscisses.

Durant l'expérience, le *matching point* a été déterminé graphiquement sur du papier millimétré, en regardant l'intersection de ces courbes. En reprenant les données *a fortiori*, on voit que les trois droites n'ont pas un unique point d'intersection, comme le montre la figure 2.17. La valeur utilisée de 15% de D_2O est donc connue avec une imprécision de l'ordre de 3%. Cette imprécision influe sur la qualité des données ; elle doit être gardée à l'esprit lors de l'appréciation des valeurs du rayon de giration et de la masse particulaire.

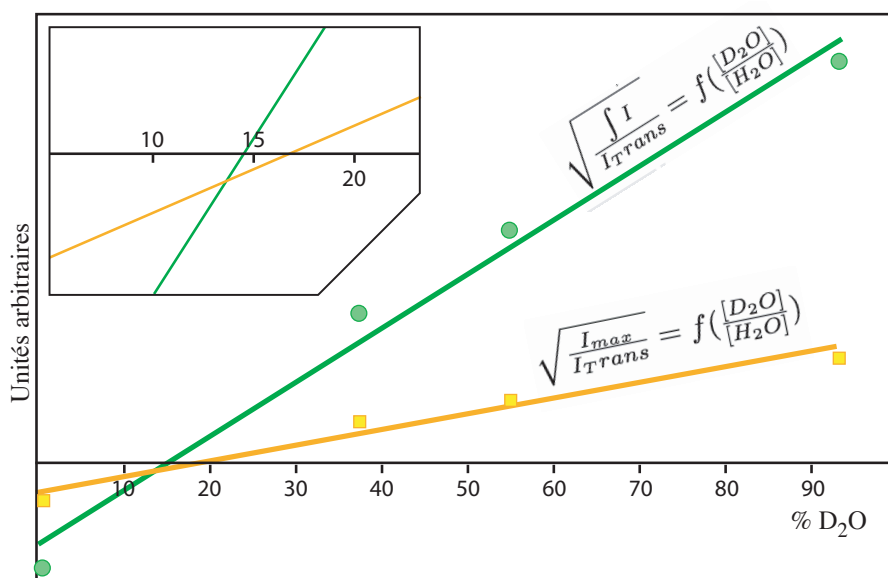


FIG. 2.17 – **Détermination graphique du matching point.** La courbe orange est la régression linéaire à partir des valeurs $\sqrt{\frac{I_{max}}{I_{trans}}}$ (carrés) pour l'échantillon « à l'identique » ; la courbe verte est la régression linéaire de $\sqrt{\frac{\int I}{I_{trans}}}$ (cercles). L'intersection de ces courbes avec l'axe des abscisses (encadré) donne le point d'annulation des contrastes.

2.3.3.2 Masse et rayon de la particule

Les résultats obtenus pour les échantillons de protéine fraîche, de protéine après cinq jours de stockage à 4°C, dans les deux cas pour deux distances entre l'échantillon et le détecteur, sont présentés dans la figure 2.18 et le tableau 2.7.

Les résultats obtenus semblent surprenants de prime abord, et difficiles à interpréter. En effet les différentes mesures sur les deux échantillons du complexe bAAC1-Lapao-lipides au point d'annulation du contraste du mélange Lapao-lipides conduisent à des valeurs de rayon de giration proche de 30 Å et à des

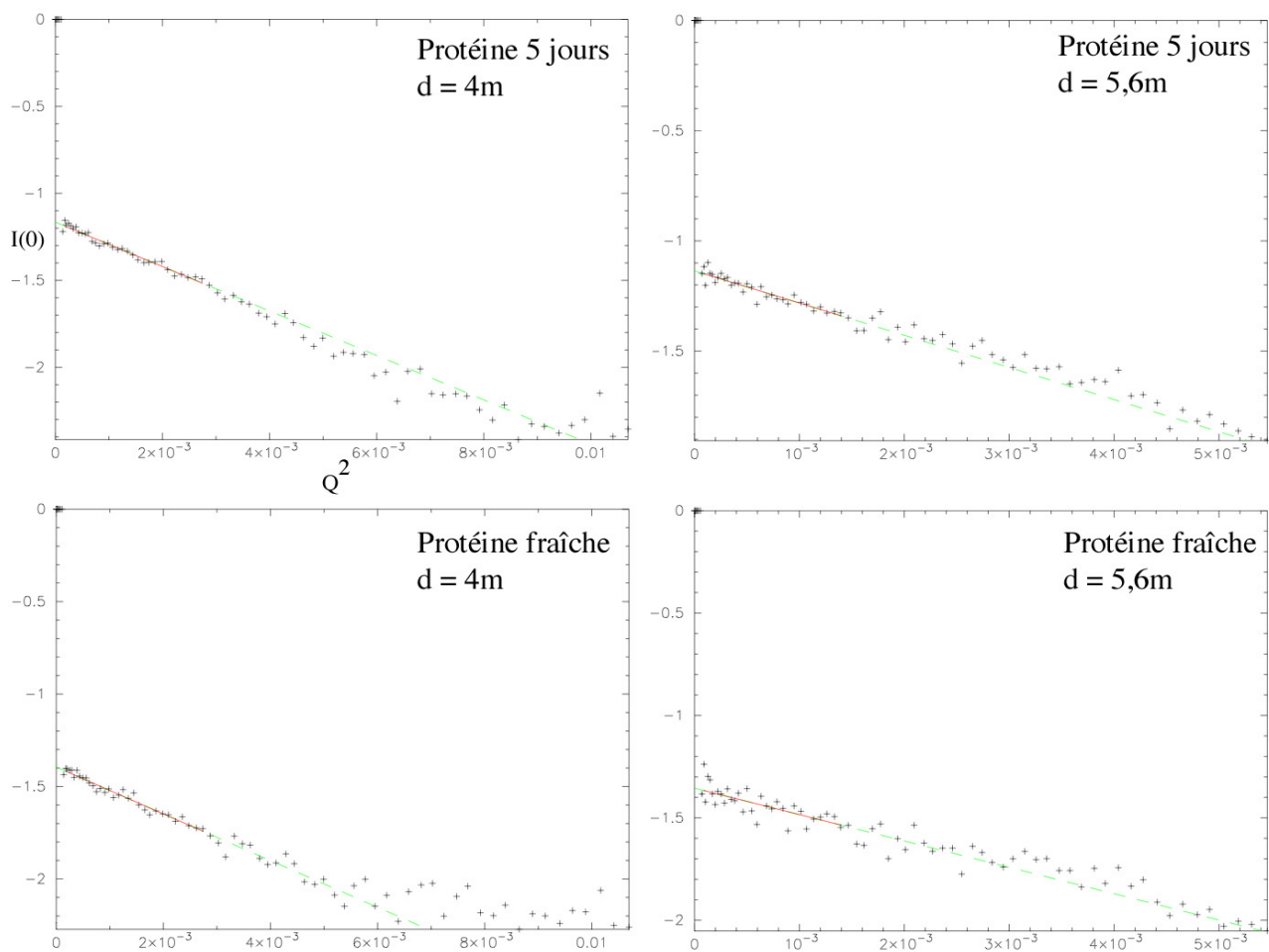


FIG. 2.18 – **Représentations de Guinier.** Les courbes sont réalisées à partir des expériences de diffusion aux petits angles de la protéine bAAC1 micellaire. Les courbes représentent $\ln(I(q)) = f(q^2)$, où $I(q)$ est l'intensité diffusée normalisée ; ces courbes sont linéaires aux petites valeurs de q (pour lesquelles $R_g q \ll 1$).

Echantillon	c_p mg/mL	$I(0)$	R_g Å	Masse particulaire kDa
5 jours	4,46	$0,0715 \pm 0,0027$	expérimentale : $31,4 \pm 1,3$	Protéine seule : 47,5 (valeur theorique : 32,8) Complexe protéique : 116 (valeur théorique : 92,8)
fraîche	3,2	$0,0424 \pm 0,0028$	expérimentale : $29,4 \pm 0,4$	Protéine seule : 40 Complexe protéique : 98
		R_g calculé	monomère protéique : $20,4 \pm 0,3$ dimère protéique : $30,4 \pm 1$ modèle de micelle : [32 44]	

TAB. 2.7 – **Paramètres déterminés à partir des expériences de diffusion.**

Pour chacun des deux échantillons, $I(0)$ permet de calculer une masse de particule dans le cas où on considère la protéine seule (cas idéal de détermination parfaite du matching point) et dans celui où on considère la micelle protéique. Dans la réalité, à cause de l'erreur possible sur ce matching point, ces deux valeurs peuvent être considérées comme les bornes de l'intervalle dans lequel la masse est plausible. Le rayon de giration R_g est donné pour les deux échantillons ainsi que sa valeur calculée pour différents modèles monomériques, dimériques (ne contenant que la protéine), ou de micelle protéine-détergent. L'accord entre valeurs expérimentales et calculées, ainsi que les erreurs sur les différents paramètres sont discutés dans le texte.

masses particulières comprises entre 40 et 47,5 kDa pour un modèle uniquement protéique. Or pour un tel modèle on attend $R_g \simeq 20$ Å et $M_p \simeq 33$ kDa.

Pour comprendre ces résultats et tenter de les interpréter plus avant, il faut garder à l'esprit la complexité du mélange contenant la protéine, dans lequel se trouve une grande quantité de détergent et de lipides non-liés. Nous avons essayé d'annuler le signal de diffusion de ces espèces le mieux possible : c'est le sens de la préparation d'échantillons « à l'identique » dans lesquels la protéine a été extraite via une séparation des phases aqueuses et organiques.

Ces échantillons, supposés représentatifs de la préparation « moins » la protéine, nous ont servi lors de la détermination du point d'annulation du contraste. Toutefois, même réalisée à ce point, la mesure reste imprécise, pour trois raisons principales :

- les échantillons « à l'identique » ne sont pas parfaits : ils contiennent encore un peu de protéine d'une part ; une petite partie du détergent et des lipides liés à probablement été éliminée d'autre part,
- il y a un large excès de détergent et de lipides : le ratio massique entre ces espèces et la protéine est grand, et une petite erreur sur le contraste va se traduire par une contribution non négligeable de ces espèces,
- le mélange au point d'annulation des contrastes est soumis à l'erreur habituelle de pipetage. Cette dernière source d'imprécision n'est pas spécifique de cette expérience, contrairement aux deux autres.

On apprend dans la littérature qu'une erreur de 1% sur le contraste conduit

à une incertitude de 10% sur la valeur de la masse particulaire [Jacrot et Zaccaï, 1981]. Si les erreurs, dans notre cas précis, sont difficiles à quantifier une à une, gardons pour la suite une grande prudence en interprétant les valeurs numériques de rayon de giration ou de masse.

Autour du rayon de giration Avec le modèle cristallographique de bAAC1, on peut calculer un rayon de giration théorique de la protéine monomérique ($20,4 \pm 0,3$ Å, l'écart-type correspond à différentes façons de réaliser le calcul, par exemple en incluant ou non les lipides structuraux), de la protéine dimérique ($30,4 \pm 1$ Å, ici l'écart-type correspond aux différents modèles dimériques utilisés). On peut également calculer R_g pour un complexe protéique protéine-détergent. En effet, même au *matching point*, le rayon de giration mesuré en diffusion de neutrons rend compte de la particule dans son ensemble et non de la seule protéine.

Dans ce cas nous n'avons pas utilisé le modèle atomique mais plutôt une représentation géométrique simplifiée du complexe membranaire. La protéine est représentée par un cylindre, entouré par un cylindre plus large et moins haut qui représente la couronne de détergent. Les détails géométriques sont donnés dans la figure 2.19.

Si les dimensions de la protéine sont connues pour un tel modèle, la taille de la couronne de détergent est un paramètre à déterminer. Nous en avons une idée indirecte à l'aide des expériences d'ultracentrifugation analytique, à travers le ratio $\frac{\text{lipides-détergent}}{\text{protéine}}$. Ce ratio B est compris dans l'intervalle $[1; 2,2]$ g/g. Le rayon de la couronne de détergent est donné par la solution de l'équation :

$$B \cdot m_p - m_d = B \cdot \frac{V_p}{\bar{v}_p} - \frac{V_d}{\bar{v}_d} \quad (2.22)$$

Dans cette expression seul V_d dépend de la taille de la couronne de détergent, les autres paramètres sont connus. On connaît en effet $\bar{v}_p = 0,741$ mL.g⁻¹ et $\bar{v}_d = 1$ mL.g⁻¹, B et le volume V_p de la protéine.

Les valeurs acceptables du rayon r_t de la couronne sont dans l'intervalle $[28; 36]$ Å si l'on fixe sa hauteur $h_d = 28$ Å. C'est la hauteur de la zone hydrophobe de la surface extérieure, d'après la structure (calcul sur le site OPM¹¹). Cette valeur est relativement arbitraire, le rayon sert alors de variable d'ajustement, ce qui explique les valeurs élevées trouvées. Elles sont significativement supérieures à la longueur d'une molécule de Lapao vue dans le modèle cristallographique, d'environ 17 Å.

Il faut également noter que les rayons de giration R_g obtenus sont sensibles aux valeurs de densités de longueur de diffusion, injectées dans le modèle, pour la protéine, les chaînes aliphatiques du détergent, les têtes polaires et le solvant. Son expression s'écrit :

¹¹ opm.phar.umich.edu/protein.php?pdbid=1okc

$$R_g = \sqrt{\frac{\int_V \Delta\rho(\mathbf{r}) \mathbf{r}^2 d\mathbf{r}}{\int_V \Delta\rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r}}} \quad (2.23)$$

On intègre cette expression en coordonnées cylindriques, en séparant les termes pour la protéine, pour les chaînes aliphatiques et pour les têtes polaires, pour obtenir :

$$R_g = \sqrt{\frac{\Delta\rho_p(\frac{h_p r_p^4}{2} + \frac{h_p^3 r_p^2}{3}) + \Delta\rho_c(\frac{h_c(r_c^4 - r_p^4)}{2} + \frac{h_c^3(r_c^2 - r_p^2)}{3}) + \Delta\rho_t(\frac{h_c(r_t^4 - r_c^4)}{2} + \frac{h_c^3(r_t^2 - r_c^2)}{3})}{\Delta\rho_p h_p r_p^2 + \Delta\rho_c h_c(r_c^2 - r_p^2) + \Delta\rho_t h_c(r_t^2 - r_c^2)}} \quad (2.24)$$

où $\Delta\rho$ est la différence de densité de longueur de diffusion entre une espèce et le solvant, h et r les hauteurs et rayons, et où les espèces sont indicées par leurs initiales, p pour la protéine, c pour les chaînes carbonées du détergent, t pour leurs têtes polaires.

Les valeurs que j'ai utilisées sont les suivantes :

ρ	$10^{-14} \text{ cm } \text{\AA}^{-3}$	Origine
ρ_p	1,88	Séquence protéique et fraction de D_2O dans le tampon
$\rho_{\text{tête}}$	0,748 ou 0,72	Valeurs pour le LDAO ou le Triton X100 [Timmins et al., 1994a]
$\rho_{\text{chaîne}}$	-0,392 ou 0,385	Valeurs pour le LDAO ou le Triton X100
ρ_{solvant}	0,483 ou -0,56	Valeurs pour l'eau ou pour un mélange au <i>matching point</i>

A ces paramètres s'ajoutent les paramètres géométriques, c'est-à-dire le rayon et la hauteur du cylindre protéique, choisis de telle sorte que le R_g en l'absence de détergent soit de 20,4 Å, en cohérence avec le modèle atomique. Ces valeurs diffèrent sensiblement de la hauteur et du rayon mesurés sur ce même modèle¹².

Le graphique de la figure 2.19 montre les courbes du rayon de giration en fonction du rayon de la couronne de détergent. On voit que la courbe correspondant au LDAO dans un solvant à 15% D₂O diverge rapidement. Par contre pour les trois autres courbes, on observe un comportement commun où R_g est lentement croissant avec le rayon de la couronne de détergent. Dans la zone correspondant à la quantité de détergent lié, déterminée en AUC, les valeurs de R_g sont dans l'intervalle [32 ; 44] Å. Pour un dimère, cet intervalle est [35 ; 45] Å.

¹²on utilise le couple $(r_p; h_p) = (22, 23)$ alors qu'on mesure $(r_p; h_p) = (29, 40)$! Il faut toutefois garder à l'esprit que la protéine comporte une grande cavité.

Nos résultats sont compatibles avec un modèle monomérique micellaire simple bAAC1-détergent où la protéine lie une quantité de détergent proche de 1,5 g/g telle que déterminée par ultracentrifugation analytique. Ils ne pas compatibles avec un modèle dimérique.

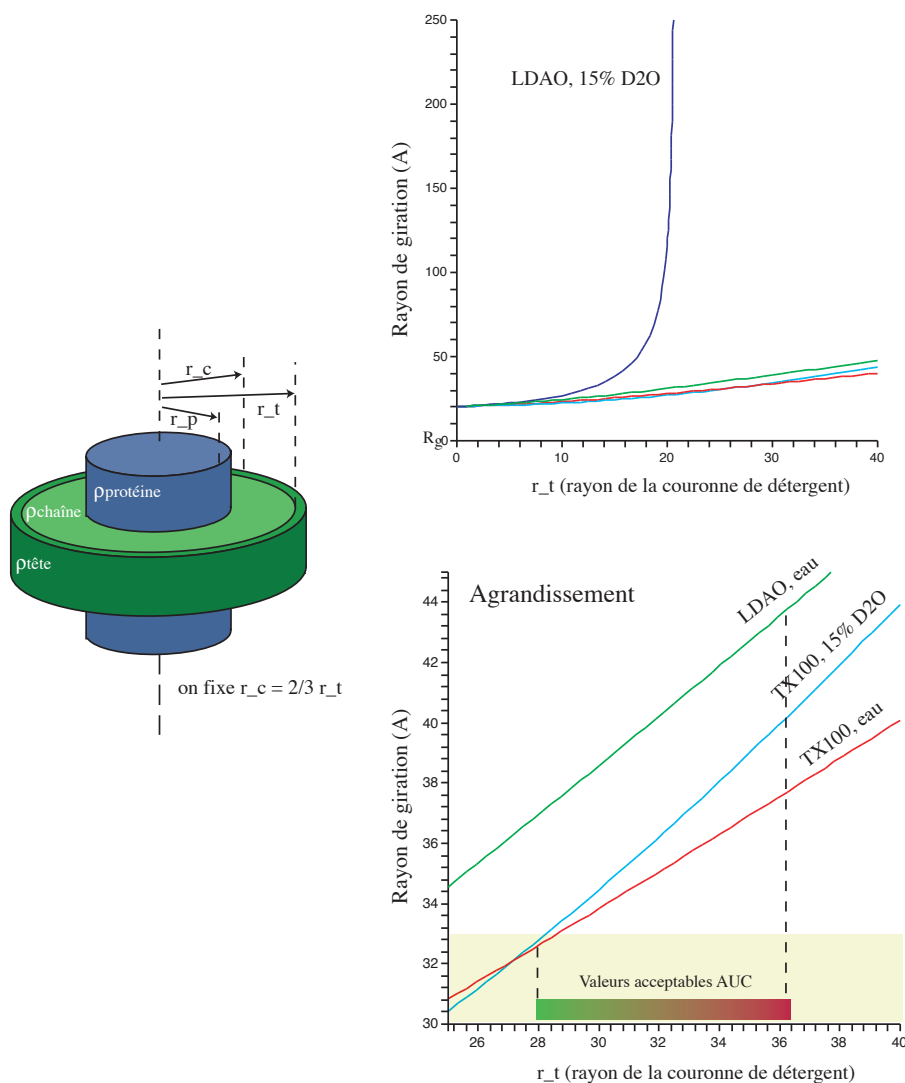


FIG. 2.19 – **Rayon de giration pour un modèle monomérique bAAC1-détergent.** La protéine est représentée par un cylindre (bleu) de rayon r_p et de hauteur h_p . Le volume de détergent est représenté par une couronne (verte) de largeur variable r_t et de hauteur 28 Å, ce qui correspond à la hauteur de la zone hydrophobe de la protéine. Les densités de longueur de diffusion pour les chaînes aliphatiques et les têtes polaires sont celles du LDAO ou du Triton X100 [Timmins et al., 1994a]. Le rayon de giration R_g est représenté en fonction de r_t (à droite). Sur ce graphe figurent aussi les valeurs expérimentales de R_g sous forme de zones beiges, et les valeurs de r_t acceptables connaissant le ratio détergent/protéine dans nos échantillons grâce à l'ultracentrifugation.

Autour de la masse d'une particule Ecrivons de nouveau la relation 2.19 :

$$I(0) = \frac{cM_p}{N_a} \cdot \frac{4\pi f T_s t}{1 - T_{eau}} \cdot (\sum b_i - \rho_s \bar{v})_g^2.$$

Cette relation donne accès à la masse de la particule dès que l'on connaît $I(0)$. Outre des facteurs géométriques et la concentration de la protéine, on y trouve le terme $(\sum b_i - \rho_s \bar{v})_g^2$ c'est-à-dire l'excès massique de longueur de diffusion de la particule par rapport au solvant.

Si nos expériences sont réalisées à un point de contraste légèrement décalé par rapport au *matching point*, la contribution à ce terme des molécules de détergent et de lipides ne va plus être nulle. Et donc suivant que l'on considère une particule uniquement protéique, ou une particule contenant également du détergent, ce terme prend des valeurs différentes et influe sur la masse de particule calculée (attention la concentration c change également, puisqu'il s'agit de la concentration massique en particule). J'ai essayé de quantifier cette influence, mais on ne peut vraisemblablement le faire que quand la perturbation introduite par la prise en compte du détergent est petite. Pour un complexe comme le nôtre, liant aux alentours de 1,5 g de détergent par gramme de protéine, il ne s'agit plus d'une petite perturbation et la valeur de M_p n'a tout simplement plus de sens physique.

2.4 Que nous disent les cristaux ?

Contrairement aux deux autres sections expérimentales de ce chapitre, celle qui commence ici n'est pas uniquement centrée sur l'oligomérisation du transporteur d'ADP et d'ATP. Nos résultats de cristallographie concernent la forme cristalline centrée du complexe bAAC1-CATR. Dans des conditions de force ionique minimale lors de la purification, nous avons obtenu de nouveaux cristaux avec une maille réduite. Ceux-ci nous permettent de décrire des interfaces d'interactions possibles entre protéines, dans l'empilement cristallin. Cette description accompagnée d'une discussion quant à leur validité justifie l'appartenance au chapitre traitant de l'oligomérisation. Toutefois, l'analyse structurale des lipides qui participent à ces interfaces présente un intérêt en soi qui dépasse ce cadre strict.

2.4.1 De la membrane au modèle cristallographique

2.4.1.1 Des mitochondries à la goutte de cristallisation

L'ensemble des échantillons d'AAC que j'ai utilisés sont produits dans le laboratoire de Gérard Brandolin (laboratoire BBSI-IRTSV, UMR CEA-CNRS-UJF 5092). Cette équipe développe depuis plus de vingt-cinq ans une expertise biochimique des mitochondries et de l'AAC. J'ai utilisé des mitochondries congelées provenant de cœur de bœuf. A cause du principe de précaution appliqué aux produits bovins, les contraintes sanitaires de préparation de mitochondries de cœur de bœuf sont fortes. Elles empêchent aujourd'hui de disposer d'organes de bêtes adultes, et les préparations les plus récentes ont été réalisées à partir d'animaux de moins de deux ans. Ces préparations de mitochondries sont effectuées par Gérard Brandolin et son équipe¹³.

La purification de bAAC1 à partir des mitochondries de cœur se déroule typiquement en cinq étapes lorsqu'on souhaite obtenir des cristaux (voir aussi l'annexe page 157).

Inhibition – solubilisation Le matériel de départ est généralement 25 ou 50 mg de protéines mitochondriales totales. Les billes congelées de mitochondries (BHM, acronyme de *Beef Heart Mitochondria*) sont diluées à 10 mg/mL dans 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,3 et incubées 5 minutes sur glace. L'ajout de 2% m/v Lapao, et une incubation de 5 minutes sur glace, permettent la solubilisation de la protéine.

Si l'on souhaite inhiber le transporteur, le milieu initial contient alors 20 μ M CATR, ou 100 μ M ATR, ou parfois 1 mM ATP. Il ne s'agit plus dans ce dernier cas d'inhibition, mais on peut imaginer qu'en l'absence d'inhibiteur, l'ajout de nucléotides permet de retarder la dénaturation de la protéine. 1 mM ATP sont alors systématiquement présents dans les tampons successifs.

Purification Les mitochondries solubilisées sont déposées sur une résine d'hydroxylapatite (HTP) (1 mL de résine décantée pour 2 mg de protéines totales)

¹³On peut par exemple en trouver le protocole dans la thèse de C. Dahout-Gonzalez.

préalablement équilibrée dans 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,3 et 0,05% m/v Lapao. La protéine bAAC1 traverse par gravité la résine, elle est éluée immédiatement après le volume mort. On collecte une fraction de 12 à 25 mL correspondant au maximum de l'absorption à 280 nm. L'allure de la courbe d'absorption est variable, elle présente souvent une épaule à gauche du pic principal.

La fraction obtenue est pure à un degré acceptable ; elle est néanmoins contaminée par une molécule absorbante de nature inconnue, vraisemblablement en partie hydrophobe (on le voit par exemple lors des expériences de centrifugation analytique ou de gradient de saccharose). La concentration de la protéine est approximativement $c_p = 0,1$ mg/mL.

Changement de milieu Afin de séparer la protéine des petites molécules résiduelles provenant des mitochondries et de modifier le milieu, la fraction précédente est déposée sur une résine AcA202, qui réalise une chromatographie d'exclusion de taille grossière mais rapide. La résine est préalablement équilibrée dans le tampon (P), (C) ou (C_{sel-})¹⁴. Ces tampons permettent d'obtenir respectivement la forme primitive, centrée, et centrée avec maille réduite des cristaux.

Il est souvent nécessaire, suivant le volume de la colonne de AcA202, de concentrer préalablement la fraction issue de la chromatographie HTP. Cette concentration est réalisée à 4°C sur une cellule Amicon de 50 mL contenant une membrane avec un seuil de coupure à 30 kDa.

En sortie de chromatographie AcA202, la fraction exclue correspondant aux espèces de haute masse moléculaire est récupérée (environ 12 mL). La concentration de la protéine est approximativement $c_p = 0,07$ mg/mL.

Diminution de la concentration en détergent La fraction précédente est incubée en présence de 100 mg de Biobeads par milligramme de protéine pure, pendant 2 heures, à 4°C et sous agitation axiale. Les Biobeads sont conservées à 4°C et pesées directement sans traitement préalable au méthanol. Cette incubation permet de réduire la quantité de détergent ; sa mise au point fut une étape cruciale de l'obtention de bon cristaux diffractants [Dahout-Gonzalez et al., 2003]. Un excès de Biobeads conduit à la précipitation de la protéine lors de la concentration.

Concentration La protéine est concentrée à 4°C et 4000 g sur un dispositif de type Centricon ou Millipore (avec un seuil de coupure à 30 kDa) jusqu'à atteindre une concentration comprise entre 5 et 10 mg/mL.

¹⁴(P) : 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,3, 1 mM EDTA (C) : 5 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,3, 1 mM EDTA ; (C_{sel-}) : 5 mM Tris-HCl pH 7,3, 1 mM EDTA. Tous trois contiennent également 0,05% m/v Lapao.

2.4.1.2 Autour des cristaux

Conditions de cristallisation Les premières pistes cristallines ont été obtenues en présence d'alcools tels que le tert-butanol (employé entre 15% et 25%), l'isopropanol (de 25 à 30%) ou le 2-méthyl-2,4-pentanediol (MPD) (de 28 à 32%).

Le précipitant qui permet d'obtenir des cristaux de bonne qualité du complexe bAAC1-CATR est la Jeffamine M-600. Suivant la concentration et le lot protéique, on l'utilise à une concentration de 27% à 32% dans le puit, qui contient également 100 mM d'un tampon de pH compris entre 6 et 8 (Cacodylate pH 6,0, Hepes pH 7,0, Tris pH 8,0). On rajoute en outre de 10 à 100 mM de sulfate de nickel (c'est le sel le plus favorable pour les cristaux de type centrés). Si l'on souhaite obtenir des cristaux de forme primitive, les additifs ioniques adéquats sont de 5 à 20 mM de citrate de sodium, de 10 à 50 mM de chlorure de césium, de 10 à 100 mM d'arsenite ou d'arséniate de sodium.

Le paramètre temps Les cristaux poussent à 20°C sur la nuit, ou en 2 jours. Ils se dégradent le plus souvent dans la semaine qui suit. Cette dégradation est visible aux dentelures qui apparaissent sur leurs arêtes. Le délai avant cristallisation a une influence certaine : les essais sont en général réalisés le jour même de la purification, parfois en deux temps. On réalise par exemple une boîte de test le jour même pour déterminer la concentration de précipitant la plus adaptée au lot, puis le lendemain des essais plus extensifs en utilisant cette concentration. Après quelques jours à 4°C, la protéine cristallise moins bien.

La protéine congelée dans l'azote liquide, conservée à -80°C puis décongelée rapidement conserve la capacité de cristalliser. On peut encore observer les variations de fluorescence intrinsèque après congélation d'une protéine non inhibée. J'ai souvent congelé mes préparations protéiques, notamment lorsque j'utilisais le robot nanogoutte Cartesian du CIBB. Nous n'avons néanmoins pas de recul sur la qualité des cristaux ainsi obtenus, puisqu'aucun des enregistrements de données à partir de cristaux « congelés » n'a été effectué sur un lot donnant une bonne diffraction.

Allures des gouttes et de cristaux Les cristaux présentent des formes diverses, qui ont toutes en commun une faible épaisseur. On observe des baguettes, des plaques, des trapèzes, des pointes de flèches. Les cristaux poussent souvent au sein d'un précipité granuleux occupant une large partie centrale de la goutte, et on constate une disparition du précipité autour d'eux. On trouve souvent de petits cristaux plaqués contre le bord de la goutte.

Les cristaux présentent en général leur grande surface à l'observation, c'est-à-dire que l'anisotropie de leur forme correspond à l'anisotropie de la goutte. Cette orientation préférentielle peut être modifiée en présence d'un champ magnétique (voir page 131).

L'effet d'orientation semble moindre dans les nanogouttes, dont la forme est presque parfaitement demi-sphérique (M. Roever, communication personnelle),

bien qu'il puisse d'agir d'une impression causée par le faible nombre de cristaux dans une nanogoutte.

Manipulation des cristaux Le précipité qui englobe les cristaux possède des propriétés mécaniques. Lors de la pêche, il arrive fréquemment qu'une partie des autres cristaux ou cristallites se déplacent dans la goutte avec le mouvement de la boucle. Néanmoins, ce précipité se désagrège facilement au contact, et il suffit de le toucher en quelques endroits autour du cristal pour en faciliter la pêche. On agit de même lorsqu'on souhaite dégager un cristal d'une « grappe ». Nos cristaux n'ont pas besoin de cryoprotectant. Une fois recueillis dans une boucle ils sont donc trempés directement dans l'azote liquide.

Reproductibilité - qualité des cristaux Il n'y a pas de relation entre la taille et la qualité des cristaux, et la relation est ténue entre leur forme et la qualité (ceux qui semblent plus épais sont en général meilleurs). Par contre il existe une relation nette bien qu'impossible à prévoir entre le lot protéique et la qualité des cristaux. Tous les cristaux ayant permis d'enregistrer des données utilisables proviennent de seulement trois lots de protéines. Ces trois préparations sont réparties sur plus de cinq ans. Rien dans la purification particulière de ces trois lots n'explique pourquoi les cristaux étaient aussi bons – ou tous les autres aussi mauvais. Cette variabilité doit donc trouver sa source dans les détails expérimentaux difficiles à quantifier. La diffraction d'un cristal du tout venant est généralement au mieux de 3 à 4 Å.

2.4.1.3 Des cristaux au modèle atomique

Le formalisme et les équations fondamentales de la cristallographie sont présentés en annexe page 160.

Enregistrement des données, obtention des facteurs de structure Nous avons enregistré plusieurs jeux de données sur les lignes BM30A et ID14 de l'ESRF à partir de deux cristaux du complexe bAAC-CATR purifié à faible force ionique. Deux jeux de qualité comparable ont été traités indépendamment jusqu'à la construction des trois cardio-lipides entourant la protéine dans la carte de densité. Seules les statistiques du meilleur jeu sont présentées, dans le tableau 2.8.

Les taches de diffraction ont été intégrées et réduites avec les programmes *Denzo* et *Scalepack*, puis avec les programmes de la suite *CCP4*. Le modèle initial a été obtenu par translation et rotation du modèle atomique 1okc pour les atomes de la protéine et de l'inhibiteur pour atteindre la position de la forme cristalline centrée.

Affinement L'affinement du modèle est réalisé par des cycles successifs de minimisation d'énergie avec le programme *CNS*, et de construction manuelle du modèle avec le logiciel *O*. Dans notre cas, avec la qualité des données utilisées,

Enregistrement	
Longueur d'onde (Å)	0,979
Détecteur	MarCCD
Distance cristal-détecteur (mm)	200
Temps d'exposition (s)	60
Rotation par image (°)	1
Nombre d'image	140
Cristal	
Groupe d'espace	C222 ₁
Paramètres de maille (Å)	(a ; b ; c)=(76,25 ; 110,75 ; 89,55)
Statistiques de diffraction	
Résolution (Å)	25-2,8
Complétude (%)	99,9 (99,9)
$\langle I/\sigma \rangle$	4,0 (1,1)
R _{sym} (%)	10,8 (56,4)
Statistiques d'affinement	
Nombre de réflexions uniques	8976
Nombre de réflexions exclues (calcul de R _{free})	459
R _{crist} (%)	25
R _{free} (%)	28,1
Nombres d'atomes (H exclus)	2515

TAB. 2.8 – **Récapitulatif de l'enregistrement et du traitement des données du complexe bAAC1-CATR.** Les nombres entre parenthèses concernent la dernière tranche de résolution entre 2,88 et 2,8 Å. Les facteurs cristallographiques sont calculés en prenant $R_{sym} = \frac{\sum_{(i,j)} |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_{(i,j)} I_i(h)}$ et $R_{crist} = \frac{\sum_h |F_{obs.}(h) - F_{calc.}(h)|}{\sum_h F_{obs}(h)}$.

on ne peut pas espérer de grosses améliorations ni du modèle ni des statistiques par l'affinement dans l'espace réciproque, et l'affinement réside surtout dans la juste interprétation des cartes de densité électronique autour des lipides. Il faut construire soigneusement et au mieux les chaînes aliphatiques. L'affinement indépendant de deux jeux de données permet de s'assurer que la carte de densité n'a pas été surinterprétée par l'opérateur.

Le modèle final comprend la chaîne polypeptidique du résidu 1 à 293 de bAAC1, une molécule de CATR et 3 cardiolipides dans l'unité asymétrique. Les facteurs de températures sont élevés au niveau du N-terminus de la protéine, et pour les lipides Les positions des atomes de la chaîne polypeptidique et de l'inhibiteur sont très proches de celles du modèle *1okc*, la déviation moyenne entre les deux structures est de 0,56 Å. Les différences sont localisées au niveau de l'extrémité N-terminale et des boucles, notamment C2 et M3 qui sont impliquées dans les contacts cristallins entre couches dans la forme centrée.

2.4.2 Analyse des empilements cristallins

2.4.2.1 Description de l'empilement

La figure 2.20 montre les empilement cristallins dans les deux formes C222₁ (celle qui nous intéresse ici) et P2₁2₁2. Les deux cristaux sont organisés en couches superposées au sein desquelles les protéines sont orientées comme dans une membrane biologique. Dans les cristaux de forme centrée, on ne trouve des molécules adjacentes alignées que le long de l'axe **c**. Pour les deux autres axes, les protéines sont en quinconce (voir le panneau du haut, dans la direction **a**, puis noter dans le panneau du bas que la rangée centrale de protéine est à l'arrière-plan de celles du haut et du bas).

2.4.2.2 Anisotropie des données

La première intuition, connaissant la forme de plaques des cristaux avec une épaisseur moindre par rapport aux deux autres dimensions, et connaissant l'empilement cristallin formé de couches empilées, pourrait être d'imaginer une direction **b*** plus faible que les deux autres du point de vue de la diffraction.

Or comme on peut le voir sur le graphique de la figure 2.21, les données de diffraction sont de meilleure qualité dans la direction **c*** que selon **a*** et **b***, où elles sont équivalentes. C'est donc en fait une des directions du plan défini par (**a***,**b***) qui est défaillante.

Ce n'est pas illogique en terme de contacts cristallins, puisque nous avons vu qu'il existe des rangées de molécules alignées dans la direction **c**, tandis que dans les directions **a** et **b** les molécules sont en quinconce. On ne peut pas quantitativement « projeter » les contacts cristallins sur les différents axes, mais on comprend qualitativement que l'empilement est moins contraint dans le plan (**a***,**b***).

2.4.2.3 Pourquoi exclure les voisins tête-bèches ?

Le transporteur d'ADP et d'ATP possède six hélices transmembranaires et ses extrémités N et C se trouvent dans l'espace intermembranaire (IMS). Cette solide assertion se base sur la structure, qui présente un nombre pair d'hélices et implique la localisation commune des extrémités. A ma connaissance, il existe deux types d'expériences qui montrent que l'insertion de la protéine dans la membrane mitochondriale expose les extrémités à l'IMS. Le premier est direct, il localise par immunochimie le N-terminus dans l'IMS, dans la conformation inhibée par le CATR [Brandolin et al., 1989]. Le deuxième est indirect : ce sont les expériences de liaison d'inhibiteurs et de profils de protéolyses qui montrent une asymétrie, conséquence d'une insertion unique dans la membrane.

L'existence de protéines membranaires de topologie duale, capable de s'insérer dans les deux sens possibles dans leur membrane native, a été récemment démontrée [Rapp et al., 2006, 2007]. Les candidats à la dualité possèdent en commun un faible biais arginine-lysine, c'est-à-dire que le nombre de résidus chargés positivement dans les boucles extra-membranaires est le même des deux côtés de la membrane. La mutation d'un unique résidu chargé de telles protéines peut alors permettre de réorienter son insertion.

Dans le cas de bAAC1, le biais arginine-lysine est de treize ; une insertion duale est peu probable. La proximité de protéines d'orientation opposées, accolées dans les cristaux, n'apporte pas d'information sur l'état oligomérique. Nous nous limiterons donc à décrire les seules interfaces entre protéines orientées dans le même sens dans l'empilement cristallin.

2.4.2.4 Description des interfaces

Les monomères A, B et C (figure 2.20) sont placés à des distances compatibles avec une interaction. Le tableau ci-dessous regroupe les caractéristiques de ces interactions ; une illustration en est donnée par la figure 2.22.

Interface	A-B	A-C
Surface d'interaction (\AA^2)	446	76
Surface d'interaction lipides exclus (\AA^2)	132	53
Cardiolipide impliqué	CDL801	CDL800
Résidus impliqués (contacts directs)	K51 ; K267	K9 ; I293

TAB. 2.9 – **Interactions entre monomères voisins.** Les surfaces d'interaction sont calculées avec le programme *naccess*.

Interface entre A et B Les deux cardiolipides CDL801 sont lovés l'un contre l'autre : les chaînes acyles issues du phosphate B viennent s'insérer entre les chaînes du cardiolipides de l'autre monomère. Il y a un contact protéique direct

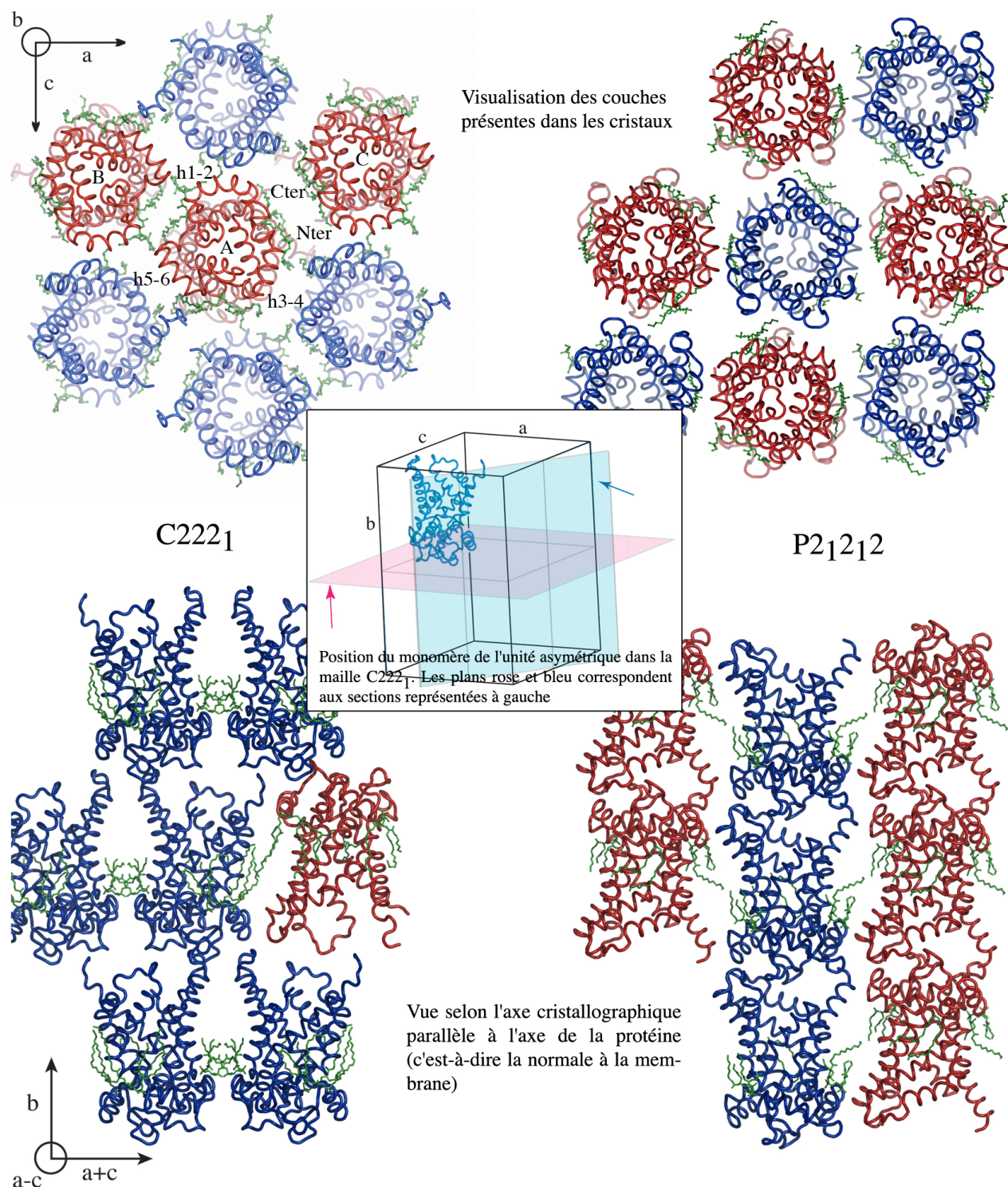


FIG. 2.20 – **Empilements des molécules dans les deux formes cristallines.** Les protéines sont colorées en bleu (IMS « vers le haut ») et rouge (matrice « vers le haut »). A gauche l'empilement dans la forme centrée, à droite dans la forme primitive. En haut les vues sont perpendiculaires à l'axe confondu avec l'axe du cylindre – ou la normale à la membrane par extension. En bas une vue parallèle à cet axe. Les orientations des plans représentés sont données pour la forme centrée, et représentée sur la maille au centre de la figure (plan rose en haut, plan bleu en bas).

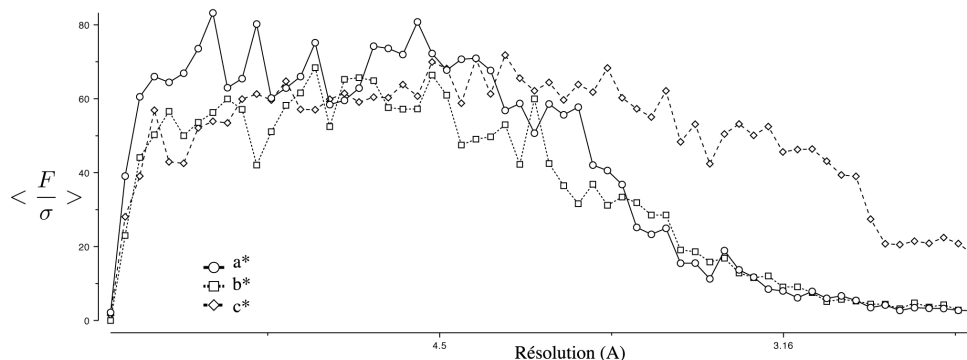


FIG. 2.21 – **Anisotropie des données de diffraction.** Les trois courbes représentent la moyenne des facteurs de structure selon chaque direction de l'espace réciproque, normalisée par la déviation standard, en fonction de la résolution. On observe une meilleure diffraction (des valeurs plus fortes) dans la direction \mathbf{a}^* que dans les deux autres directions.

entre l'azote de K267^A et l'oxygène de la chaîne principale de K51^B (et vice versa, à cause de la symétrie). Les boucles C2 se font face.

Interface entre A et C Au niveau de cette interface les protéines sont globalement plus éloignées qu'au niveau de l'interface A-B. Il y a un contact protéique direct entre l'azote de K9^A et l'oxygène de la chaîne principale de I293^B. Ce sont donc les extrémités N- et C-terminales qui se font face.

2.4.2.5 Quelle pertinence biologique pour les interfaces dans les cristaux ?

La surface latérale de la protéine L'analyse de la surface de la protéine au niveau des zones de contact vues dans les cristaux peut aider à identifier si elles ont un sens biologique. Pour effectuer cette analyse on peut construire des indicateurs de pertinence des interfaces qui se basent sur l'ampleur de la surface impliquée dans le contact et/ou sur sa conservation, en suivant l'esprit du travail de Valdar et Thornton [2001].

Ces auteurs examinent des interfaces cristallines de protéines solubles, et utilisent la bioinformatique pour élaborer un indicateur de leur caractère artificiel ou non. En substance, ils affirment que la concomitance d'une importante surface d'interaction et d'une assez bonne conservation est un bon indicateur de la pertinence biologique. Cependant sont relevés des cas de contacts pertinents peu importants et peu conservés.

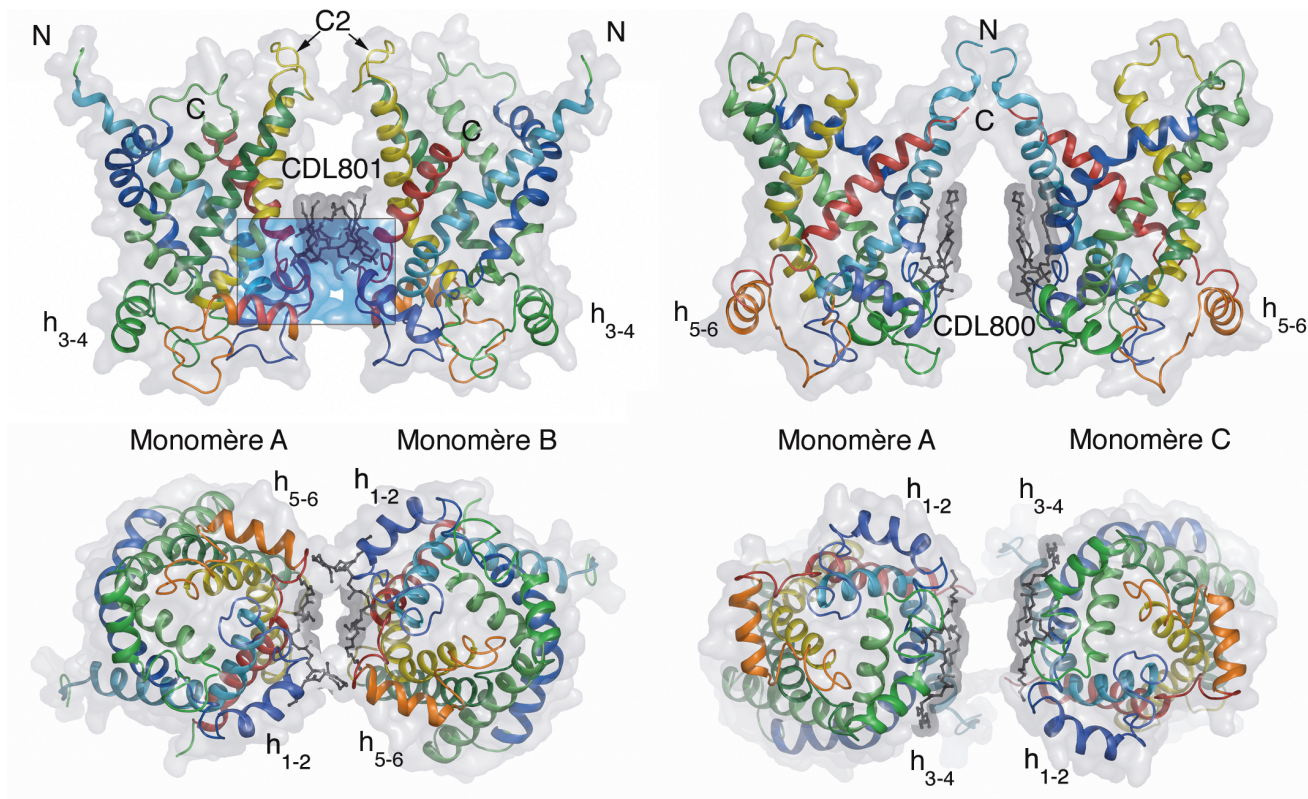


FIG. 2.22 – **Interactions entre monomères voisins.** Les protéines A et B, A et C sont représentées vues dans le plan de la membrane (en haut) et depuis la matrice (en bas). Les protéines sont représentées en rubans et surface transparente, les lipides en gris, bâtons et surface transparente.

La surface d'interaction est faible pour les interfaces entre A et B, plus encore entre A et C. Néanmoins le cas des protéines membranaires est sans doute particulier vis-à-vis de ce paramètre, puisque la contrainte de diffusion dans l'espace bidimensionnel de la bicouche favorise la formation d'oligomères (voir la page 26).

On peut également examiner la surface latérale de la protéine en terme de **conservation**. Pour cela on sélectionne l'ensemble des acides aminés qui répondent aux deux critères : être exposés au solvant, être exposés majoritairement sur cette surface latérale. Il est alors possible d'examiner la conservation de cette surface en fonction de l'endroit où l'on se place (figure 2.23.b), de la position verticale dans la membrane (figure 2.23.a), ou encore comparer la surface latérale à la cavité, à la zone placée entre les monomères A et B, etc... (figure 2.23.c)

Le but d'un tel examen est de faire ressortir, si elle existe, une zone particulière de la surface latérale, qui pourrait ne pas avoir été repérée par l'examen manuel du modèle cristallin. Cet examen peut être mené avec d'autres paramètres pour chaque résidu : l'exposition au solvant, le volume du résidu¹⁵ (ces deux derniers ne sont pas représentés sur la figure).

Aucun des indicateurs examinés ne fait ressortir comme particulière une quelconque zone du pourtour de la protéine. On voit sur le panneau (a) que la conservation n'est pas plus forte au niveau du feuillet interne auquel appartiennent les cardiolipides structuraux dans la sous-famille des AAC ; c'est par contre le cas si l'on compare l'ensemble de la MCF. Le panneau (b) montre qu'il n'y a pas de variations significatives de la conservation le long de la surface latérale ; les zones se trouvant « derrière » les cardiolipides ne présentent pas une meilleure conservation. Le panneau (c) permet de comparer la conservation des différents sous-ensemble de résidus exposés de la protéine. On note que la conservation moyenne de la surface latérale est du même ordre que celle pour toute la protéine, que la conservation de la zone entre les monomères A et B est plus faible que cette moyenne. Celle de la zone entre A et C est supérieure à la moyenne.

Bien que cela ne soit pas l'objet de notre discussion il est particulièrement intéressant de noter la forte conservation des résidus non exposés au solvant, qui ont comme autre particularité de se situer dans un intervalle étroit en hauteur selon la direction orthogonale à la membrane (voir également le paragraphe *Mécanisme de transport* page 147).

Nos indicateurs doivent être considérés comme semi-quantitatifs : la sélection des résidus appartenant à la surface latérale est soumise à l'appréciation de l'opérateur, parfois les cardinaux des ensembles sur lesquels les moyennes sont calculées sont petits, et les écart-types importants. Néanmoins l'absence de spécificité, quelle que soit la propriété observée, d'une zone quelconque de la surface latérale, dans la conformation inhibée par le CATR, est un argument en faveur de l'aspect artéfactuel des interfaces que nous observons.

¹⁵Ce dernier peut être intéressant dans la mesure où la présence de résidus de petit volume favorise le rapprochement entre hélices, et peut donc intervenir dans des interfaces.

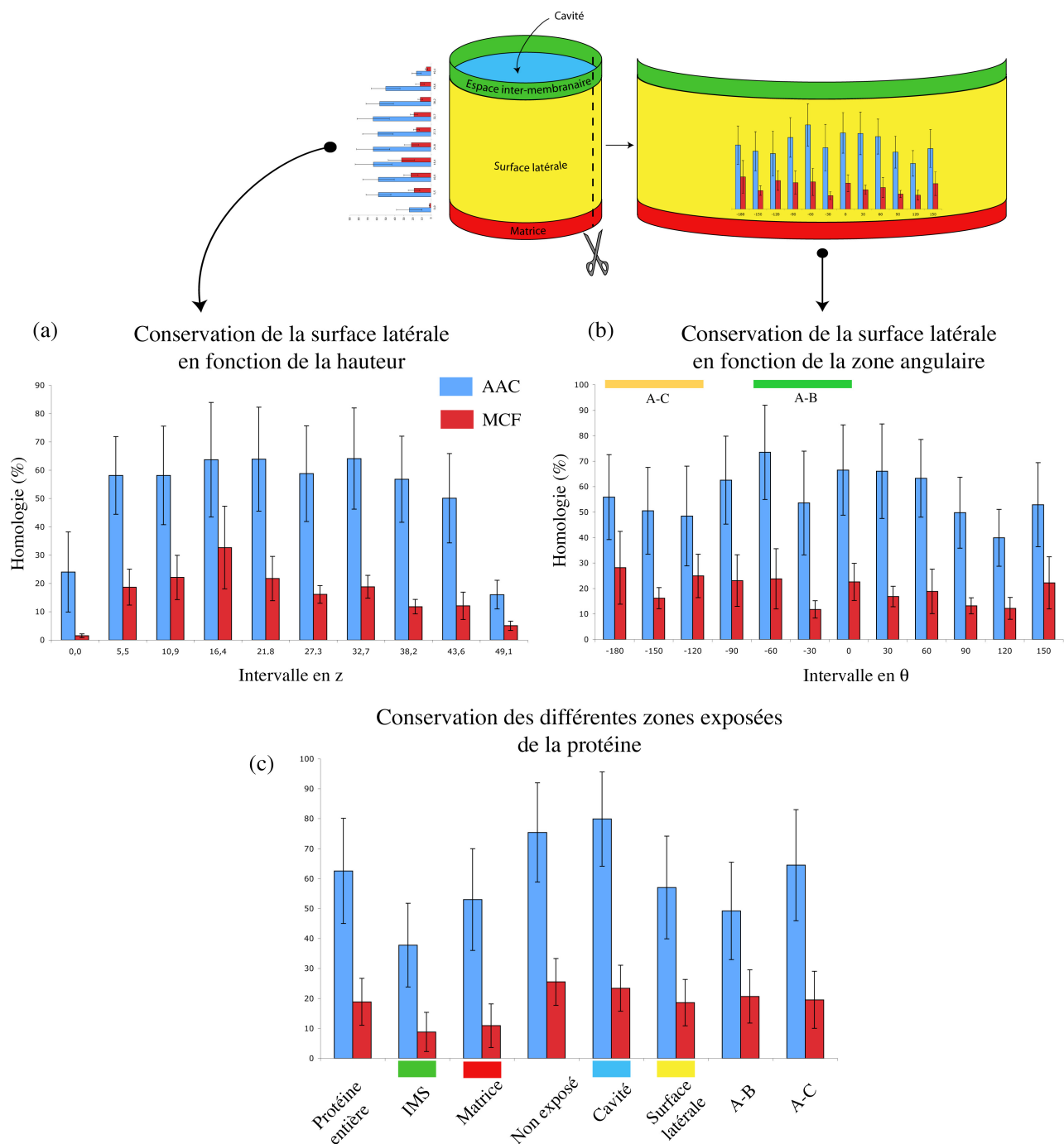


FIG. 2.23 – **Surface latérale et conservation.** Le schéma du haut permet de comprendre à quoi se rapporte les histogrammes. La protéine, représenté par un cylindre, est subdivisé en cinq zones : les résidus exposés dans la cavité (bleu), côté espace intermembranaire (vert), sur la surface latérale (jaune), côté matriciel (rouge) ou non exposé (non représenté). **(a)** Histogramme par intervalle de hauteur le long de l'axe perpendiculaire à la membrane de la conservation des résidus de la surface latérale, dans la sous-famille des AAC (bleu), et dans la famille MCF (pourpre). **(b)** Histogramme par intervalle angulaire (voir aussi la figure 38) de la conservation des résidus de la surface latérale, dans la sous-famille des AAC (bleu), et dans la famille MCF (pourpre). **(c)** Même histogramme de conservation pour les différents sous-ensembles décrits sur le schéma et pour les résidus de la surface situés au niveau des interface A-B et A-C. Il est intéressant de noter la forte conservation de la cavité, l'étonnante conservation des résidus non exposée, et la meilleure conservation de l'interface A-C par rapport à A-B.

Dans un article publié en 2005 (Nury et al. [2005]¹⁶ : *Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers*, nous décrivons nos résultats de cristallographie obtenus avec le complexe bAAC1-CATR purifié à faible force ionique.

Nous y expliquons que l'interface entre les monomères A et B était compatible avec les expériences décrites dans la littérature, celles de microscopie électronique [Kunji et Harding, 2003] et de pontage des résidus cystéines [Hashimoto et al., 1999] notamment. Dans le même temps, nous réaffirmions la nécessité de données expérimentales supplémentaires pour asseoir la réalité biologique de l'interface décrite.

Toutefois le cœur du travail expérimental qui y est rapporté à trait aux cardiolipides vus dans la densité électronique. Nous revenons sur l'analyse de ces lipides dans la section ci-dessous.

2.4.3 Les cardiolipides liés à la protéine

2.4.3.1 Les lipides des complexes membranaires

Le couplage entre protéines membranaires et lipides est intime Les protéines membranaires sont insérées dans des bicouches lipidiques qui ne constituent pas seulement une matrice hydrophobe uniforme. Les interactions entre protéines et lipides sont étroites et souvent spécifiques. En effet, ces interactions doivent **permettre les réarrangements structuraux** qui accompagnent la fonction de nombreuses protéines (par exemple la Ca^+ -ATPase ou le cytochrome *bc1*) tout en **gardant intact l'imperméabilité et la sélectivité** de la membrane.

Diverses indications de l'importance de ce couplage peuvent être citées. La première couche de lipides qui entourent une protéine peut présenter une mobilité restreinte [Marsh et Horvath, 1998]. Des domaines lipidiques de composition particulière –les « rafts »– sont le lieu de résidence de protéines spécifiques. Le type de lipides présent dans une membrane peut influencer sur l'activité des protéines présentes [Dowhan, 1997].

Assemblage, stabilité et fonction Les lipides peuvent influencer sur le repliement, le maintien de la structure, et l'activité des protéines membranaires.

Tout d'abord, la présence de phosphatidylethanolamine est nécessaire au bon **repliement** de LacY, comme le montre l'étude de son assemblage chez des souches de *E. coli* dépourvues de ce lipide [Bogdanov et Dowhan, 1998]. De même le contenu en lipides anioniques peut moduler le sens de l'insertion de mutants de la leader peptidase [van Klompenburg et al., 1997].

Ensuite, il a été proposé que la particularité des lipides des archaebactérie assure une plus grande **stabilité** aux complexes membranaires comme la bactériorhodospine, dans une gamme étendue de température ou de pH [Pomerleau et al., 1995] ; participant à la survie en conditions extrêmes. En l'absence de lipides le cytochrome *bc1* perd conjointement sa fonction et son organisation

¹⁶Cet article est placé à la fin du texte du manuscrit.

oligomérique [Schägger et al., 1990]. Les lipides liés à la protéine pourraient également diminuer le « mismatch » hydrophobe en adaptant localement l'épaisseur de la membrane [quelle référence ?].

Enfin, et ce dernier point peut être couplé à l'assemblage ou à la stabilité, il existe des exemples nombreux de **modulation de l'activité** des protéines membranaires par les lipides. Citons entre autres la bactériorhodopsine [Epan, 1998], la calcium ATPase [Lee, 1998], la cytochrome C oxydase [Pfeiffer et al., 2003], les transporteurs mitochondriaux de citrate [Giudetti et al., 2002], de phosphate [Kadenbach et al., 1982], d'ADP et d'ATP [Hoffmann et al., 1994].

Etude du couplage protéine-lipides en membrane, en micelles, dans les cristaux Les études en **membrane native**, qui utilisent une souche mutante incapable de produire un lipide particulier, permettent de mesurer l'activité d'une protéine dans son environnement naturel [Bogdanov et Dowhan, 1998, Jiang et al., 2000]. Cependant leur interprétation est toujours complexe : par exemple l'absence de cardiolipides dans la mitochondrie peut influencer de plusieurs façons sur le transport d'ADP.

Les travaux en **systèmes reconstitués** sont complémentaires des précédents, car ils présentent l'avantage de s'intéresser à une protéine pure, placée dans un milieu contrôlé. Toutefois la purification réalisée au préalable doit permettre de conserver l'activité et la stabilité de la protéine.

En effet, les conditions de manipulation des complexes membranaires en solution, notamment la présence ou l'ajout de lipides, conditionnent leur état fonctionnel. Ainsi l'ajout de lipides est nécessaire pour maintenir l'activité du cytochrome *b6f* solubilisé en Hécamed [Pierre et al., 1995] ; l'addition de phosphatidylcholine réactive le PSII solubilisé en Triton X100 [Ruan et al., 2002] ; la stabilité du transporteur d'ATP inhibé par l'ATR (mais pas par le CATR) dépend du rapport entre protéine et lipides [Beyer et Klingenberg, 1985].

Une fois les protéines solubilisées, purifiées et **cristallisées**, la position des lipides organisés visibles dans les cartes de densité électronique peut apporter des informations sur le(s) rôle(s) qu'ils jouent. Les nombreuses structures possédant des lipides associés¹⁷ permettent de définir un éventail de ces rôles, qui vont du positionnement vertical adéquat au maintien de l'oligométrie en passant par une participation à la fonction (pour revue voir Palsdottir et Hunte [2004]).

2.4.3.2 Les cardiolipides : une particularité mitochondriale ?

Les cardiolipides (CDL) sont des « doubles » phospholipides, qui possèdent deux groupements phosphates reliés par un glycérol, et quatre chaînes aliphatiques.

Si l'on trouve des cardiolipides dans la plupart des membranes biologiques, leur importance est particulière dans les membranes internes de mitochondries (qui contiennent de 10% à 20% de CDL). Le phénotype d'une souche de *E. coli* mutante ne produisant pas de cardiolipides est proche du phénotype de la

¹⁷Une liste en est disponible sur le web à l'adresse sb20.lbl.gov/lipids.html

souche sauvage. A l'inverse, de nombreuses protéines mitochondriales présentent une activité CDL-dépendante, et les levures dépourvues de ces lipides montrent diverses déficiences [quelle référence ?].

Cardiolipides et transporteur d'ADP et d'ATP Dès 1985, Beyer identifie la liaison forte de six molécules de cardiolipides par dimère d'AAC [Beyer et Klingenberg, 1985], difficiles à détacher, et qui disparaissent si la protéine est dénaturée. Une dizaine d'années plus tard, le groupe de Beyer publie un article intéressant qui rapporte la modulation de la fixation d'un composé fluorescent sur la cystéine 56 *via* l'ajout de cardiolipides [Beyer et Nuscher, 1996]. Lors de l'ajout d'ADP au complexe AAC-ATR solubilisé en Triton X100, les auteurs observent la fixation d'un composé fluorescent (le N-(1pyrenyl)maleimide ou PYM) sur C56 qui devient accessible. La vitesse de fixation du PYM ainsi que le taux de fixation avant ajout d'ADP sont modulés par les cardiolipides. La présence de cardiolipides ralentit fortement la vitesse de fixation du PYM. Elle diminue la fixation préalable à l'ajout d'ADP, potentiellement corrélée à un mauvais repliement (figure 2.24). Cet effet est spécifique des cardiolipides, il est perdu lorsque le pont reliant les groupements phosphate est digéré.

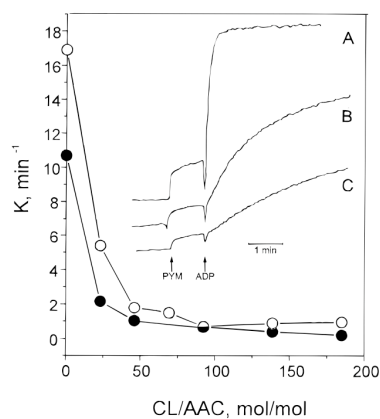


FIG. 2.24 – **Influence des cardiolipides sur la fixation du PYM.** Cette figure, reprise de Beyer et Nuscher [1996] montre la dépendance de la vitesse initiale de fixation du PYM sur l'AAC. Les symboles ouverts correspondent à la présence d'un excès de BA, les symboles fermés à une préparation sans inhibiteur. L'insert, plus intéressant que les courbes, représente la trace de fluorescence obtenue après ajout de PYM sans cardiolipides (A), avec un ratio molaire de 46 (B) ou de 139 (C).

Bien qu'une souche de levure dépourvue de cardiolipides conserve la capacité de croître sur une source de carbone non fermentescible [Jiang et al., 1997], l'activité de l'AAC est dans ce cas inférieure à 1/5 de l'activité de la protéine de

la souche sauvage [Jiang et al., 2000]. De plus l'activité des mutants C73S, K179I et K182I de scAAC2 est strictement dépendante de la présence de cardiolipides lorsque mesurée en liposomes [Hoffmann et al., 1994].

La présence de cardiolipides permet d'autre part une augmentation de l'activité du transporteur de phosphate, et évite sa dénaturation lors de la solubilisation en Triton X100 [Kadenbach et al., 1982]; le transporteur de citrate d'anguille, dont les mitochondries sont enrichies en cardiolipides, est plus actif que son homologue chez le rat [Giudetti et al., 2002].

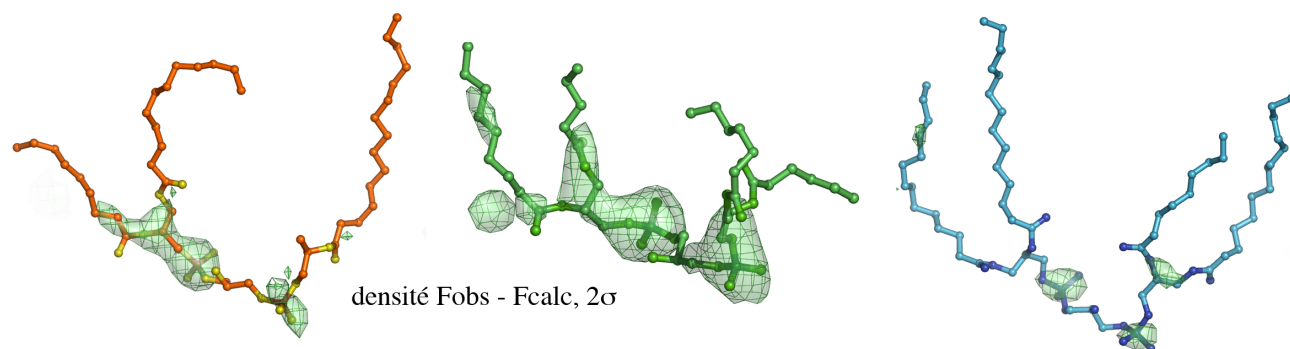
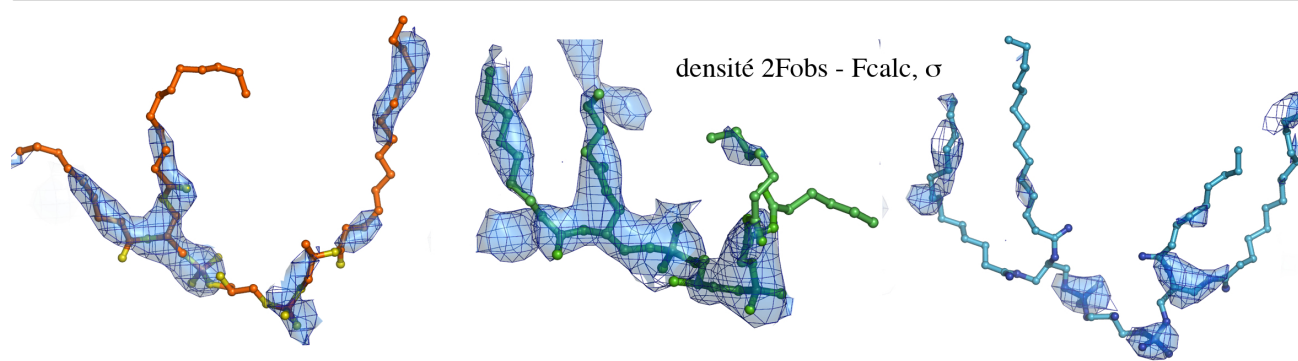
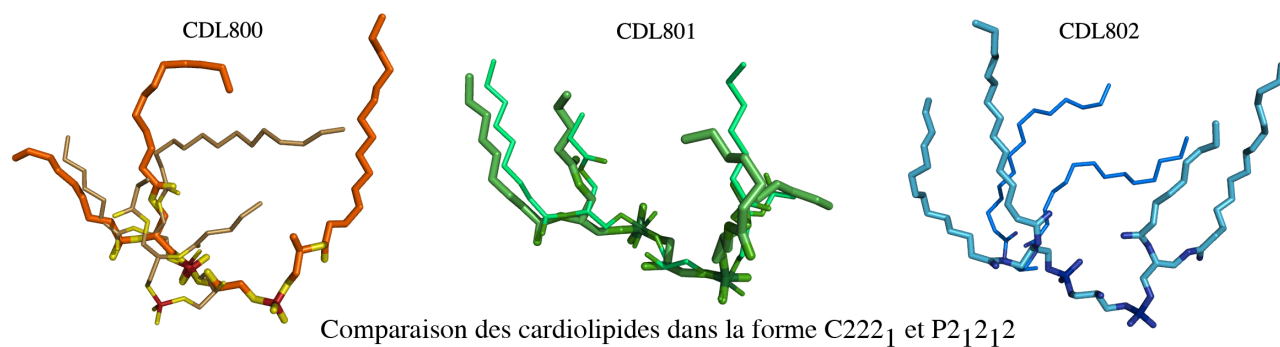
2.4.3.3 Trois cardiolipides entourent l'AAC

Dans toute la suite, les cardiolipides sont représentés en orange, vert et bleu pour les CDL800, 801 et 802 respectivement. La conformation des trois cardiolipides qui entourent bAAC1 est illustré par la figure 2.25. Les interactions de ces lipides avec la protéine sont montrées par la figure 2.26 et récapitulées par la figure 2.27.

Le cardiolipide CDL800 Les groupements phosphates de ce cardiolipide inter-agissent avec les atomes d'azote de la chaîne principale des résidus L156, G157 et N158 pour le premier, de G72 et L74 pour le second (figure 2.26.a). Dans la forme cristalline primitive, ce lipide est replié sur lui-même, et seul ces deux derniers résidus inter-agissent avec le phosphate. Les positions et la définition des chaînes acyles sont également largement différentes entre les deux formes cristalline : une seule chaîne recourbée est visible dans la forme primitive. Il y a une interaction de *stacking* entre le résidu W70 et une des chaînes acyles du lipide.

Le cardiolipide CDL801 Les groupements phosphate de ce cardiolipide inter-agissent avec les atomes d'azote de la chaîne principale des résidus de I53 et I54 pour le premier, de G272, A273, W274 et S275 pour le second (figure 2.26.b). Il y a une interaction de *stacking* entre une des chaînes acyles du lipide et le résidu F270. Une autre chaîne forme une liaison hydrogène avec l'azote indole de W274.

Le cardiolipide CDL802 Ce lipide est peu défini dans la forme primitive, et il adopte une conformation différente de celle vue dans la forme centrée. Les groupements phosphate inter-agissent avec les atomes d'azote de la chaîne principale des résidus de T252 et G253 pour le premier, de N177 pour le second (figure 2.26.c). Il y a une interaction de *stacking* entre le résidu Y173 et une des chaînes acyles du lipide.



Position des cardiolipides par rapport à la protéine, dans la forme C222₁



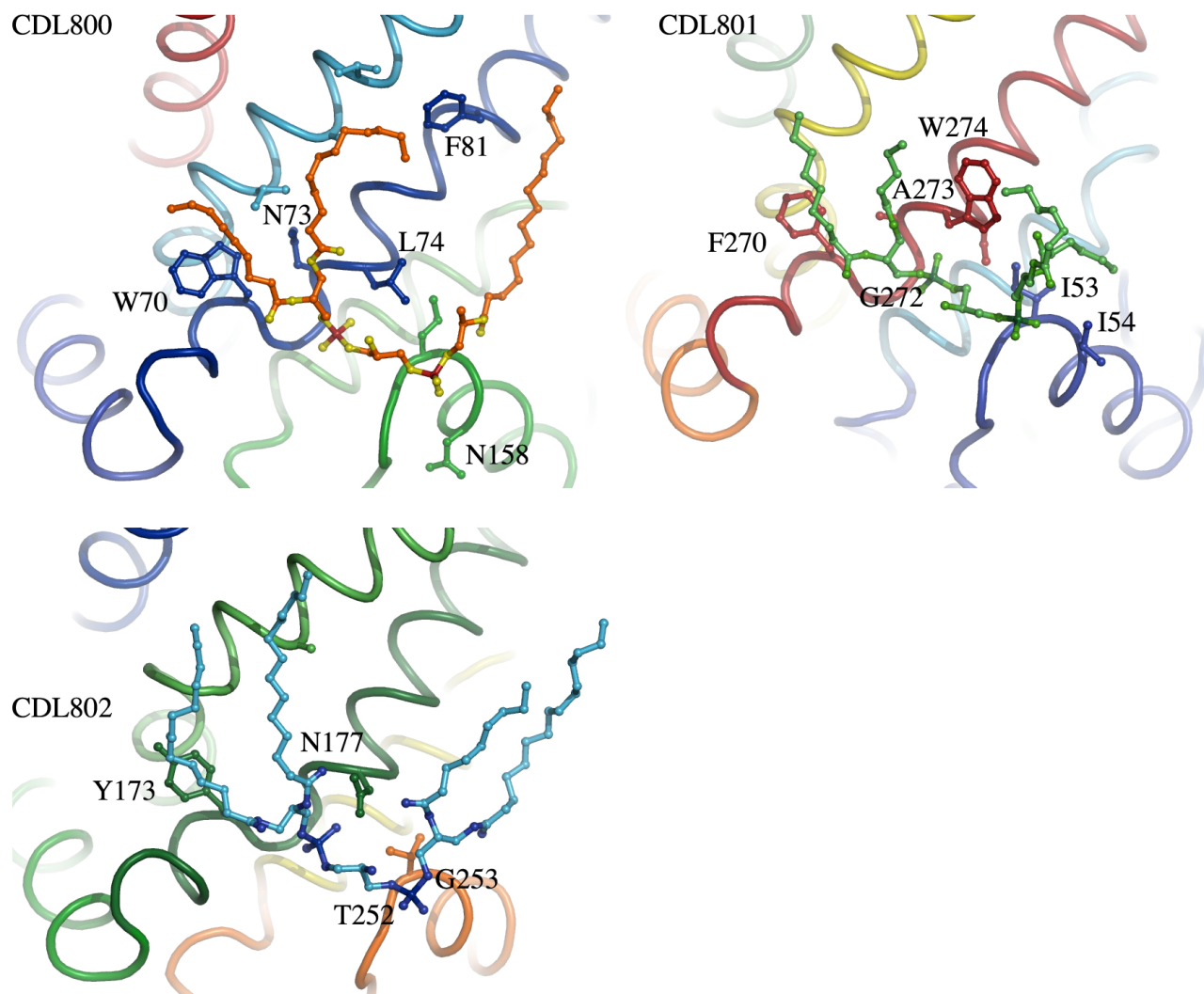


FIG. 2.26 – **Interactions des cardiolipides avec la protéine.** Les cardiolipides sont représentés en orange, vert et bleu pour les CDL800, 801 et 802 respectivement. Les atomes de phosphore, d'oxygène, et de carbone portent des couleurs différentes. Les principaux résidus interagissant avec les lipides sont représentés par des batonnets.

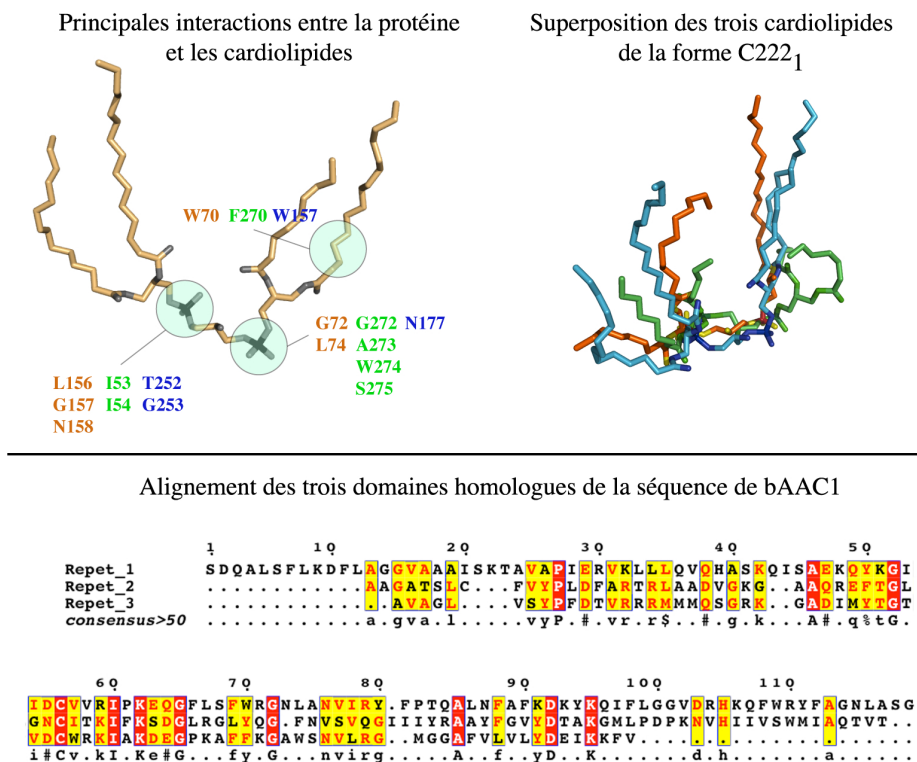


FIG. 2.27 – Cardiolipides et pseudo-symétrie interne.

Les cardiolipides et la pseudo-symétrie interne On peut voir sur la figure 2.27 que les cardiolipides interagissent notamment avec des résidus similaires de chacun des trois domaines de bAAC1. Ils occupent des positions obéissant à la pseudo-symétrie d'ordre trois, et leurs parties polaires sont superposables. Les chaînes aliphatiques par contre présentent des conformations différentes. Le cardiolipide CDL801 est de loin le mieux défini dans les cartes de densité électronique ; ses chaînes sont moins étendues que celles des deux autres lipides.

2.4.3.4 Quel(s) rôle(s) pour les cardiolipides de l'AAC ?

Dans un article de 2005 [Nury et al., 2005], nous avons évoqué trois rôles possibles pour les cardiolipides : **participer à une interface de dimérisation et au dialogue entre monomères** ; assurer une meilleure stabilité structurale du complexe ; accompagner les changements de conformations.

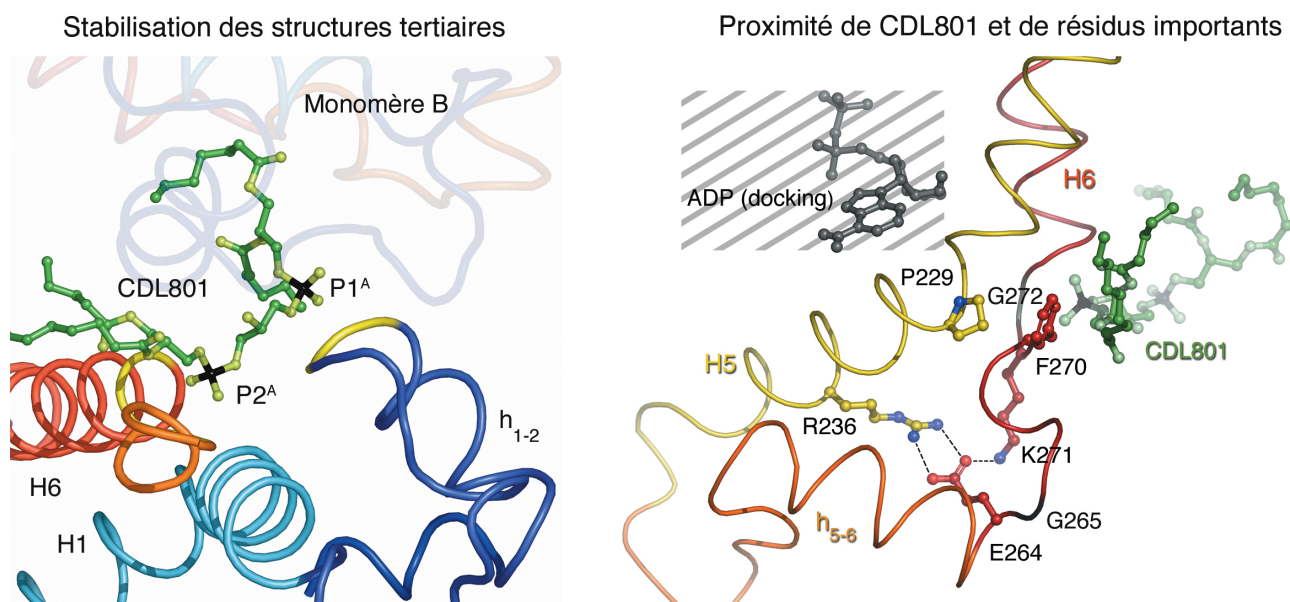


FIG. 2.28 – **Quels rôles peut-on imaginer pour le CDL801 à partir de la structure ?** Le panneau de gauche montre le rôle d'agrafe entre des éléments de structure secondaires que joue les cardiolipides (ici le CDL801). Le panneau de droite montre la position particulière du CDL801, et les résidus qui l'entourent. L'éventuelle implication de ce cardiolipides dans le mécanisme de transport est discutée à la fin du manuscrit.

Dimérisation. Nous avons vu qu'il n'y a pas d'indicateurs clairs de pertinence pour les interfaces dimériques des cristaux. Les interfaces décrites sont possibles plus que plausible; toutefois cela ne signifie pas que les cardiolipides n'interviennent pas dans un dialogue éventuel entre monomères. Dans la membrane, si deux molécules d'AAC se trouvent côte-à-côte et coopèrent, si un cardiolipide accompagne les mouvements protéiques, il serait étonnant qu'il ne soit pas impliqué dans la coopération. Il faut garder à l'esprit que les cardiolipides couvrent la protéine sur plus de la moitié de sa surface au niveau du feuillet interne. Néanmoins, tant que l'oligomérisation en membrane ne sera pas connue, cette participation au dialogue restera hypothétique.

Stabilité structurale. Les cardiolipides « agrafent » le début des hélices transmembranaires paires et les petits segments hélicaux matriciels (figure 2.28). En cela ils participent à la stabilité du complexe. Ce rôle de stabilisation conforte les résultats de la biochimie qui témoignent d'une meilleure activité de transport en présence de cardiolipides, pour des protéines mutantes ou destabilisées pendant la purification [Hoffmann et al., 1994, Beyer et Klingenberg, 1985].

Rôle fonctionnel. Enfin, en regroupant données biochimiques et structurales, on peut dessiner l'ébauche d'un mécanisme de transport dans lequel les cardiolipides jouent un rôle fonctionnel d'accompagnement. Comme cette ébauche reste largement hypothétique, je l'ai placée dans la section *Mécanisme de transport* du dernier chapitre, page 147.

2.5 Discussion

Nous avons passé en revue l'abondante littérature qui argumente en faveur d'une organisation dimérique du transporteur d'ADP et d'ATP. Nous avons ensuite présenté des expériences biophysiques de caractérisation de l'état oligomérique, puis nos résultats de cristallographie.

Ce que disent les expériences biophysiques Les résultats de l'ultracentrifugation analytique montrent que bAAC1 est un monomère en solution. Ces résultats sont appuyés par des expériences récentes de chromatographie par exclusion de taille et de sédimentation à l'équilibre, qui mettent en évidence un monomère de scAAC2 et scAAC3 dans différents détergents [Bamber et al., 2006]. Par contre, nos résultats sont en désaccord avec ceux obtenus au début des années 1980 dans le groupe de Klingenberg [Hackenberg et Klingenberg, 1980, Lin et al., 1980]. Si on analyse les profils de sédimentation présentés dans la figure 6 de Hackenberg et Klingenberg [1980], on note que la raideur du front pour le complexe protéine-lipides-détergent est moindre que celle du front pour la micelle de détergent. Le complexe protéique est vraisemblablement plus gros que la micelle, et devrait donc présenter un front plus raide (car $D \propto 1/R_H$ d'après la relation Stokes-Einstein). Est-il possible que ce front corresponde à un mélange d'espèces non résolues ?

Nos expériences de diffusion de neutrons, conduites avec des échantillons monomériques donnent des résultats proches de ceux obtenus par Block et al. [1982]. Toutefois les conclusions sont opposées. Tout en mettant l'accent sur l'incertitude qui entâche la détermination du point de contraste, nous montrons l'accord possible des données avec un modèle monomérique, tandis que Block et al. [1982] concluent que la protéine est dimérique.

Il y a de fortes similitudes entre la conduite des expériences de diffusion de neutrons de Block et des nôtres. Les deux utilisent la protéine bovine inhibée par le CATR, solubilisée en Lapao. Les méthodes de purification sont identiques, à l'exception de l'incubation en présence de Biobeads. En 1982 le point d'annulation du contraste est déterminé avec une solution de Lapao à 4%, il est de 10% D₂O. Nous utilisons un extrait de membrane mitochondriale solubilisé en Lapao (environ 12%), quasi dénué de protéine, et déterminons un *matching point* de 15% environ. Les valeurs de rayon de giration (30 Å environ dans les deux cas) sont identiques, alors que celles de masse particulaire (entre 56 kDa et 61 kDa pour Block, et entre 40 et 47 kDa pour nous) sont différentes.

Dans notre cas, la détermination de *matching point* pose problème à cause de la complexité du mélange qui contient beaucoup de lipides et de détergent. Ce même problème, plus aigu encore en l'absence de traitement par Biobeads, devait exister en 1982. Nous avons vu que si l'on se place légèrement à côté du *matching point*, alors le détergent lié intervenait dans le calcul de la masse à partir de $I(0)$ – rendant non pertinente la valeur calculée. Nous avons également vu qu'un rayon de giration de 30 Å était compatible avec un complexe monomérique liant

environ 1,5 g/g de détergent. Enfin l'ultracentrifugation nous permet de savoir que notre protéine est monomérique.

L'ensemble de ces arguments permet de conclure à une interprétation erronée des résultats de [Block et al., 1982]. On ne peut donc pas s'appuyer sur cette expérience pour défendre un modèle dimérique.

Il est intéressant de remarquer la spécificité de la longue étude des transporteurs mitochondriaux. Nous avons étudié l'oligomérisation à l'aide de techniques déjà employées pour ce système au moment de ma naissance. Lorsque des expériences contradictoires sont séparées par plus de vingt ans, il peut être difficile de les comparer. Depuis les années 1980, les appareils comme les outils sous-jacents ont progressé. Par exemple, on peut aujourd'hui obtenir *ab initio* l'enveloppe d'une protéine à partir de données de diffusion aux petits angles, grâce aux développements du groupe de D. Svergun ; les programmes de P. Schulk permettent la modélisation conjointe d'expériences de diffusion de lumière, d'ultracentrifugation...

Il faut également veiller à ne pas réinterpréter une querelle des classiques et des modernes. Pour un « petit nouveau », il est plus facile de bien connaître les travaux récents, ceux qui mettent en relief le questionnement quant au dimère, que d'avoir une vue claire de l'impressionnante masse de travaux accumulés depuis les années 1970 qui le supportent.

Ce que disent les expériences de liaison des inhibiteurs Un argument fort en faveur d'une organisation dimérique est la stoechiométrie de liaison du CATR, mesurée dans les années 1970 [Riccio et al., 1975b]. Il faut moitié moins de CATR que de protéine pour inhiber totalement le transport. La valeur de cette stoechiométrie dépend de la concentration protéique mesurée. Celle-ci est obtenue après solubilisation par un dosage colorimétrique de Lowry, qui n'est pas toujours en accord avec la microanalyse en acides aminés.

La stoechiométrie 2 :1 de liaison du BA est régulièrement décrite comme démontrée par des travaux de Aquila et al. [1978]. Toutefois les auteurs de cet article insistent sur la difficulté de quantifier la fixation spécifique de ce composé lipophile. Des quantités équivalentes de CATR et de BA sont fixées en l'absence d'ADP et sans extraction de Brij ; par contre en présence d'ADP et après extraction de Brij il est possible de fixer quatre fois plus de BA que de CATR pour une même quantité de protéine.

La courbe de saturation du CATR présente une forme sigmoïdale [Vignais et al., 1971] caractéristique d'une coopérativité entre plusieurs sites de liaison par unité fonctionnelle. Or sur la base de la structure il est difficile d'imaginer plusieurs sites CATR par monomère. Cette coopérativité plaide donc pour une organisation supramoléculaire. Notons que si l'on combine coopérativité et stoechiométrie 2 :1, alors l'oligomère requis est un minimum un tétramère.

La présence de nucléotides augmente le nombre total de sites de fixation pour les deux classes d'inhibiteurs (voir Vignais et al. [1973] pour le CATR et Aquila et al. [1978] pour le BA). Il peut s'agir d'un phénomène de démasquage (avec un site secondaire pour le nucléotide) ou d'un phénomène d'interconversion, qui

implique alors une dynamique de l'assemblage oligomérique.

Ce que disent les chimères dimériques La fusion de deux gènes codant pour l'AAC permet de restaurer la croissance d'une souche de levure dépourvue d'AAC endogène [Trézéguet et al., 2000]. Deux transporteurs sont donc capables de fonctionner côte-à-côte. De plus la sensibilité des hétérochimères AAC-PiC aux inhibiteurs spécifiques des deux transporteurs [Postis et al., 2005] montre une interaction entre « sous-unités ». Pour expliquer cette interaction dans le cadre d'un modèle dimérique, les auteurs proposent une dynamique de l'association/dissociation des AAC. L'étude de la biogenèse des transporteurs mitochondriaux aboutit également à une proposition d'association dynamique [Dyall et al., 2003].

Ce que dit la structure La structure du transporteur bovin bAAC1 en complexe avec le CATR est celle d'un monomère. Dans les cristaux de forme centrée, obtenus après purification à faible force ionique, les cardiolipides structuraux sont mieux définis, et séparent des monomères adjacents de même orientation. Dans un article récent, Bamber et al. [2006] affirment qu'un dimère ne peut faire intervenir uniquement les cardiolipides au niveau de l'interface. L'argument est qu'il est nécessaire qu'interviennent des liaisons protéine-protéine spécifiques pour différencier les transporteurs MCF entre eux. Toutefois, les cardiolipides occupent plus de la moitié de la surface latérale de la protéine au niveau du feuillet interne. Il est donc difficile d'imaginer un assemblage supramoléculaire qui ne fasse pas intervenir ces lipides.

Une organisation fragile Nous avons vu que la bAAC1 est monomérique en solution ; nous avons relevé les indices d'une organisation supramoléculaire. Si cette organisation existe, elle est suffisamment faible pour ne pas être mise en évidence en présence de détergent et de sels à assez haute concentration.

Les protéines membranaires abondantes sont souvent organisées en zones denses au sein des membranes biologiques (un exemple récent est l'organisation de VDAC dans la membrane externe mitochondriale, Goncalves et al. [2007]).

Une organisation dense de l'AAC dans la membrane interne des mitochondries permettrait d'expliquer la plupart des expériences d'oligométrie. Une telle organisation n'implique pas forcément de collaboration fonctionnelle, bien que des changements de conformations coordonnés puissent être favorables. De telles zones sont souvent pauvres en lipides. Nous avons toutefois passé en revue les arguments en faveur d'un couplage structural et fonctionnel de l'AAC et des cardiolipides (voir aussi à partir de la page page 147), et je pense que ce couplage serait conservé dans une organisation dense.

Chapitre 3

Vers la structure d'une autre conformation

S'il n'existe pas de méthode générale, rapide ou toujours couronnée de succès pour obtenir une structure de protéine membranaire, quelques balises jalonnent cependant le chemin qui mène de la protéine en membrane au cristal diffractant. La stabilisation d'une conformation protéique à l'aide d'un substrat et le bon contrôle du complexe protéine-lipides-détergent sont deux de ces jalons.

Le mécanisme du transport d'ADP et d'ATP, bien qu'on puisse espérer l'entrevoir par une approche de dynamique moléculaire sur la base de la structure existante, ne sera pas compris dans sa globalité avant qu'au moins une autre conformation du transporteur soit connue à l'échelle atomique. Ce chapitre aborde quelques problèmes posés par la recherche de cette autre conformation. Il rapporte les tentatives –pour le moment infructueuses– que nous avons réalisées pour y répondre.

3.1 Beaucoup de détergent et de lipides

3.1.1 Un mélange complexe

Le contrôle des constituants d'un complexe membranaire est parfois primordial Pour d'assez nombreux systèmes, le type, la quantité de lipides et de détergent exercent une influence déterminante sur la cristallisation. Ainsi la lactose perméase de *E. coli* cristallise sous trois formes différentes en fonction de la quantité de phospholipides qui lui sont associés [Guan et al., 2006]. Si le ratio lipides-protéine est inférieur à 8, les cristaux sont hexagonaux et diffractent à 5 Å, s'il est compris entre 9 et 16 les cristaux sont tétragonaux et diffractent à 2,6 Å, enfin s'il est compris entre 18 et 25 les cristaux sont orthorhombiques et diffractent à 3 Å. Le transporteur de glycérol phosphate de *E. coli* ne donne des cristaux isotropes intéressants que dans un mélange de DDM et de C₁₂E₉ de stoechiométrie précise 2,5 :1 [Lemieux et al., 2003].

La diminution de moitié de la concentration en détergent a été une des étapes cruciales de la résolution de structure du complexe bAAC1-CATR [Dahout-Gonzalez et al., 2003].

Un mélange complexe Le dosage du détergent en utilisant du Lapao radioactif, et le dosage des lipides par la quantification du phosphore, permettent de déterminer un ratio protéine-lipides-détergent dans la solution utilisée pour la cristallisation. Ce rapport est d'environ 1 :170 :1000 en nombre de moles. De nombreux lipides et beaucoup de détergent sont donc co-purifiés, et accompagnent la protéine de sa solubilisation à la concentration finale.

Le mélange final est donc complexe et le contrôle exercé sur ce mélange est difficile, ce que reflète le fait que peu de préparations donnent de bons cristaux. Tous les jeux de données utilisables pour la résolution de structure, depuis le début du travail sur l'AAC au laboratoire, ont été enregistrés avec des cristaux issus de seulement trois lots de purification !

Des constituants difficiles à séparer Un unique pic d'élution avec un épaulement est obtenu lors du passage de la préparation protéique sur une colonne de chromatographie par exclusion de taille (figure 3.1). Après dépôt sur un gradient de densité, les constituants ne sont correctement séparés qu'avec une longue durée de centrifugation.

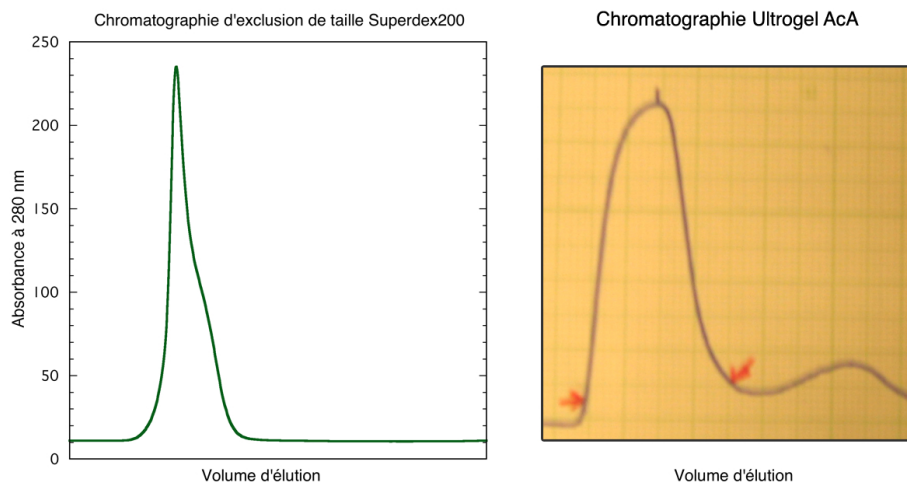


FIG. 3.1 – **Chromatographie d'exclusion de taille du complexe bAAC1.** A gauche le profil d'élution du complexe protéique –et des espèces co-purifiées– sur une colonne analytique Superdex200. A droite la chromatographie préparative sur colonne Ultrogel AcA du même échantillon. Dans les deux cas, on observe un pic d'élution unique contenant les micelles protéiques et celles dépourvues de protéine.

Les propriétés hydrodynamiques des complexes protéine-détergent et des

micelles qui ne contiennent pas d'AAC sont donc proches. La comparaison des rayons de particules obtenus en ultracentrifugation analytique, par la diffusion de neutrons ou par la diffusion dynamique de lumière nous le confirme.

Ainsi le rayon hydrodynamique obtenu pour le complexe protéique est de 38 ± 2 Å en AUC, alors que celui calculé pour des micelles de Lapao pures est de 31 Å. La diffusion des neutrons est compatible avec un rayon de giration de 31 ± 2 Å ; des mesures de diffusion de lumière (appareil du laboratoire DynaPro de Protein Solutions) donnent un rayon de giration de 28 à 32 Å pour la micelle de Lapao, et de 37 à 39 Å pour les particules dans la solution protéique avant cristallisation. Attention toutefois de garder en tête que ces valeurs ne sont pas comparables directement d'une technique à l'autre.

3.1.2 Quelle stratégie adopter ?

Le problème de l'instabilité en l'absence de substrat L'AAC solubilisé est instable lorsque sa conformation n'est pas bloquée par un inhibiteur. Par exemple, les changements de fluorescence intrinsèque lors de l'ajout d'inhibiteurs ne sont plus observables avec une préparation de plus de quelques heures. De plus, lors d'un essai de purification de la protéine en l'absence de CATR, ajouté seulement dans les gouttes de cristallisation, nous avons obtenu –au mieux– de vilains cristaux qui ne diffractent pas.

Il manque une chromatographie d'affinité pour l'AAC bovine On peut décrire la chromatographie d'hydroxylapatite, qui permet de séparer l'AAC des autres protéines mitochondriales, comme une méthode de purification inversée. Tous les « contaminants » sont retenus par la résine et seule l'AAC est éluée. Il n'existe pas de résine de chromatographie qui permette la rétention de la protéine. Les résines commerciales vendues pour lier les protéines ayant l'ATP comme substrat ne sont pas utiles pour bAAC1 (par exemple mes essais avec les résines ATP-Binders de Novagen¹, BlueCartridge de Biorad ou HiTrap blue de GE lifescience ont été infructueux).

La chromatographie d'affinité est bien sûr accessible aux protéines recombinantes produites chez la levure ou en bactérie, qui peuvent être munies d'une étiquette appropriée. Le système bovin garde toutefois le double avantage de l'abondance et d'une conformation initiale correcte (contrairement à la production en bactérie).

Une double utilité pour un ligand ou un partenaire protéique L'emploi d'un ligand ou d'un partenaire convenablement modifié peut permettre de résoudre à la fois le problème de la stabilité, par le blocage d'une conformation, et le problème du contrôle de l'environnement, en permettant l'ancrage sur une résine de chromatographie.

¹Il s'agit d'une résine Sépharose fonctionnalisée avec un ATP par l'intermédiaire d'une chaîne à 10 carbones reliée à son phosphate γ .

Ancrage avec un ligand modifié Les atractylosides sont des composés naturels. Leur ancrage sur une résine sans perte d'affinité passe par la fonctionnalisation au niveau de l'alcool primaire du glucose (figure 1.6 page 12). Il n'existe à ma connaissance qu'un unique travail décrivant la synthèse d'une telle résine succinyl-ATR-amino-sepharose [Vignais et al., 1979]. Or, lors de la synthèse, il y a compétition entre l'alcool primaire et l'alcool secondaire, puis lors du couplage au motif aminé, entre le carboxylate du succinyl et celui de l'ATR. De plus la liaison ester d'ancrage reste légèrement labile en milieu aqueux. Le couplage strictement contrôlé d'un atractyloside à une résine via l'alcool primaire est un problème de chimie compliqué, long, incertain (L. Lebeau, communication personnelle). Une alternative plus abordable pourrait être le couplage via l'acide carboxylique ; néanmoins celui-ci joue un rôle dans l'interaction avec la protéine.

Nous avons envisagé l'usage de nucléotides modifiés connus pour se fixer sur le transporteur (par exemple le naphthoyl-ADP ou un ADP cagé) lors de la cristallisation. Il n'est pas économiquement possible de réaliser la purification avec de tels nucléotides. En effet leur affinité pour l'AAC est faible, et il faut donc que tous les tampons contiennent de l'ordre de 1 mM de ces composés, souvent très chers. Néanmoins, si on dispose du moyen d'échanger un substrat pour un autre, on peut imaginer, par exemple, une purification en présence d'ATR qui serait échangé pour un nucléotide modifié à la fin.

Afin de ne pas diminuer l'affinité –déjà faible pour un usage en chromatographie– d'un nucléotide modifié pour l'AAC, il convient de le greffer sur une résine en position 2' ou 3' du sucre (voir la figure 1.5 à la page 11). Divers dérivés commerciaux de nucléosides sur ces positions sont disponibles (par exemple chez Trilink Biotechnologies). Leur couplage avec une résine de type Ultrogel Aca via un bras hydrosoluble de taille bien choisie semble possible. Quelques discussions ont eu lieu avec des chimistes disposant de l'expertise nécessaire dans le domaine des nucléotides modifiés.

Utilisation de partenaires protéiques Le rôle de l'AAC dans l'apoptose est débattu. Les défenseurs de son implication dans la transition de perméabilité lui attribuent des partenaires protéiques. L'affinité entre l'AAC et certains de ces partenaires est évaluée autour du nanomolaire (voir la page 105). Sur cette base, le détournement de l'interaction entre l'AAC et un de ses partenaires à des fins de purification est une idée plausible, et même séduisante.

Nous nous sommes donc engagés sur cette piste, parce que nous disposions des compétences pour la parcourir, et parce que les perspectives en cas de succès nous semblaient très intéressantes.

Néanmoins, avant de rendre compte des essais d'interaction entre l'AAC et les deux partenaires que nous avons utilisés (la cyclophiline D d'une part, et Vpr d'autre part), il convient de rapporter une série d'essais rapides qui n'ont pas été poursuivis faute de temps et concernent la préparation des échantillons de protéine. C'est l'objet de la prochaine section.

3.1.3 Essais divers autour de la séparation des constituants du mélange

3.1.3.1 Séparation de l'excès de détergent par gradient de densité

La migration dans un gradient en concentration de saccharose a parfois été utilisée pour la préparation d'échantillons d'AAC. Ces échantillons étaient destinés à l'ultracentrifugation analytique [Hackenberg et Klingenberg, 1980] ou à l'analyse des cardiolipides [Beyer et Klingenberg, 1985] [Hoffmann et al., 1994].

Nous avons préparé des gradients par congélation, par superposition de couches de densités différentes, et à l'aide d'un mélangeur commercial. Dans notre cas ces méthodes donnent des résultats équivalents, c'est la dernière que nous avons employée systématiquement après les premiers essais. Des gradients de 2% à 20% de saccharose sont bien adaptés à notre complexe protéique. Le tampon est généralement celui de la chromatographie AcA (voir page 72).

La figure 3.3 illustre les résultats de la séparation du complexe protéique d'avec l'excès de détergent et de lipides. On constate que la protéine se comporte de manière nettement différente en fonction du détergent présent dans le gradient. Ces différences de comportement pourraient ouvrir la porte à de nouvelles pistes de cristallisation (figure 3.2).

Il est important de noter la durée inhabituelle de centrifugation de la protéine déposée sur gradient de saccharose. En effet, une centrifugation à 100000 g toute la nuit ne suffit pas à séparer les micelles protéiques de celles ne contenant pas d'AAC. Les paramètres hydrodynamiques mesurés en ultracentrifugation analytique explique cette « mauvaise » séparation : le complexe protéique sédimente faiblement.

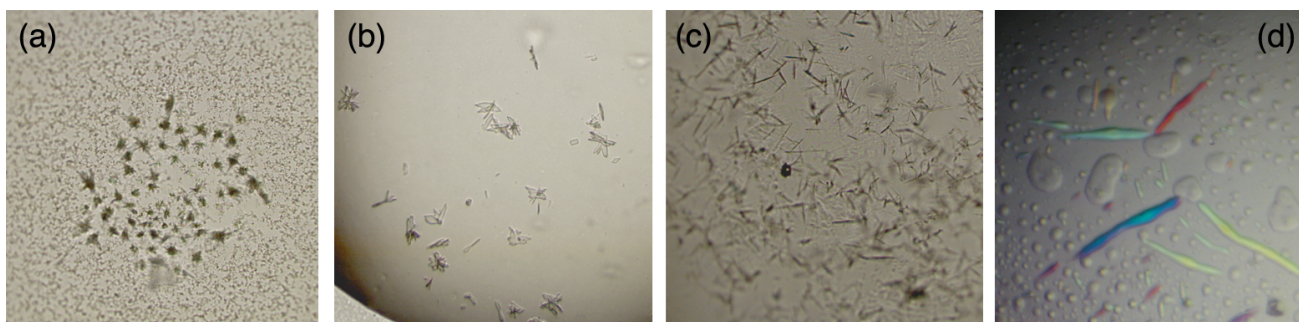


FIG. 3.2 – **Pistes cristallines en sortie de gradient de saccharose.** Un échantillon similaire aux fractions du fond du tube de la figure suivante (panneau de gauche) a été soumis à un test de cristallisation. Parmi les quelques six cents conditions testées, on obtient des pistes cristallines. **(a)** 0,01 M sulfate de zinc, 25% PEG-MME 550 dans un tampon Mes pH 6,5 **(b)** 0,01 M chlorure de magnésium, 4 M chlorure de lithium dans un tampon Hepes pH 7 **(c)** 0,2 M chlorure de calcium, 14% PEG 400 dans un tampon Hepes pH 7,5. Enfin, **(d)** correspond à un échantillon du haut du gradient, avec beaucoup de lipides et de détergent mais presque pas de protéine. On observe alors parfois des objets organisés biréfringents en présence de PEG.

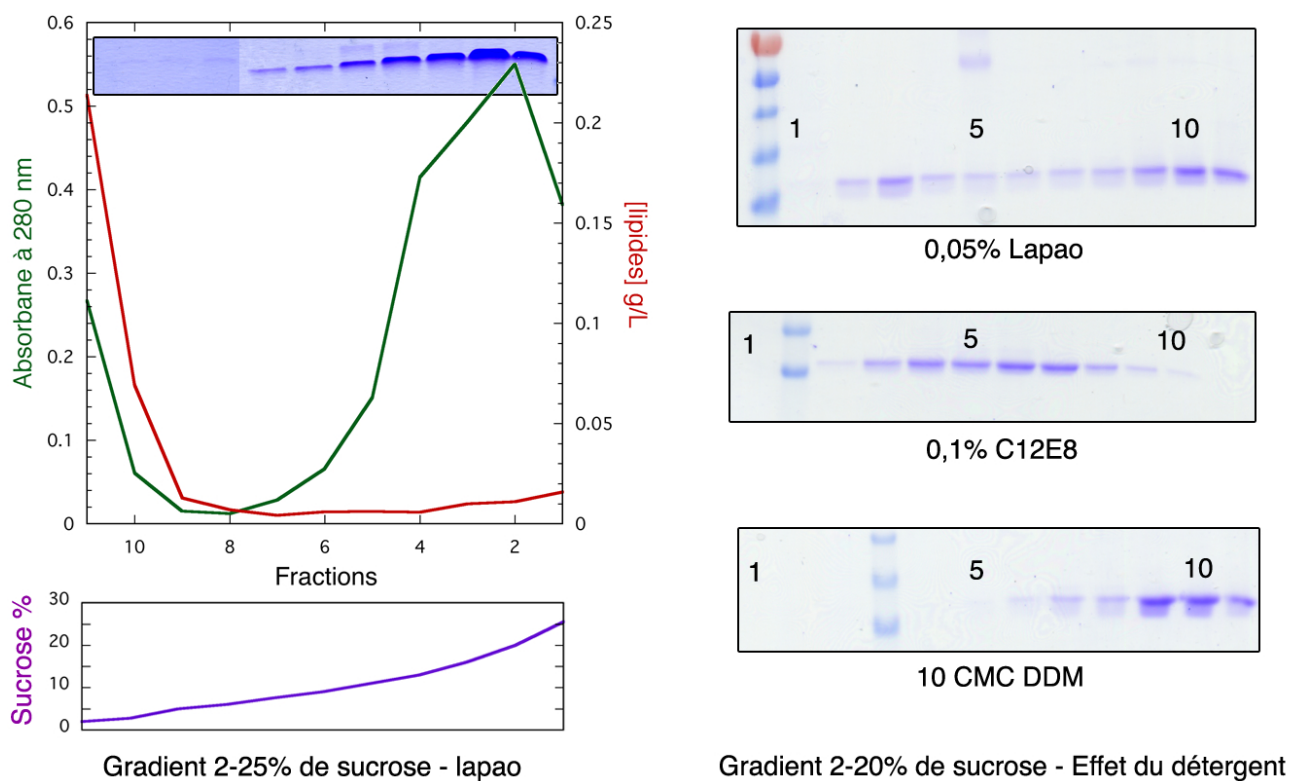


FIG. 3.3 – Migration du complexe bAAC1 dans un gradient de saccharose. A gauche on peut voir la bonne séparation entre le complexe protéique et les lipides (et le détergent) surnuméraires. La courbe rouge donne la concentration approximative en lipides dans chaque fraction : les lipides restent à la surface du gradient tandis que la protéine descend au fond. Le pic d'absorbance vers la surface est dû à un contaminant inconnu qui absorbe à 280 nm. A droite on peut voir l'effet du détergent sur la répartition dans le gradient des complexes protéiques. Les différences sont grandes entre Lapao, C12E8 et DDM. A noter la différence entre le gradient Lapao de gauche et celui de droite, qui reflète des conditions expérimentales certes légèrement différentes, mais aussi une variabilité intrinsèque de nos préparations.

3.1.3.2 Utilisation d'amphipols

Les amphipols sont des molécules tensio-actives non détergentes, des polymères amphipiles, capables de maintenir en solution les protéines membranaires. (pour revue voir [Popot et al., 2003], et pour les diverses applications : maintien en solution [Prata et al., 2001], stabilisation [Picard et al., 2006], aide au repliement [Pocanschi et al., 2006], etc...)

Nous avons testé l'influence de l'ajout d'amphipols sur le comportement de bAAC1. Ces tests sont nés d'une question double : peuvent-ils jouer un rôle de stabilisation de la protéine ? Peuvent-ils servir d'ancres –non spécifiques– pour la retenir sur une résine et permettre le contrôle de son environnement ? Ils ont été possibles en collaboration avec Jean-Luc Popot (IBPC), qui a fourni matériel et conseils, et grâce à Fabrice Guisti (IBPC) qui a préparé l'amphipol A8-35 et son homologue biotinylé.

Une stabilisation en présence d'amphipols ? L'attachement multipoints d'une molécule d'amphipol sur une protéine membranaire peut être à l'origine d'un effet de stabilisation d'une conformation, par exemple dans le cas de la calcium-ATPase [Champeil et al., 2000] [Picard et al., 2006]. Cette stabilisation est imagée sous le nom « d'effet Gulliver ». Nous avons vu que les conformations inhibées de l'AAC se caractérisent par des états différents de fluorescence intrinsèque. Les changements de fluorescence observables en détergent sont totalement supprimés par un ajout d'amphipols (4 g par gramme de protéine) (figure 3.4).

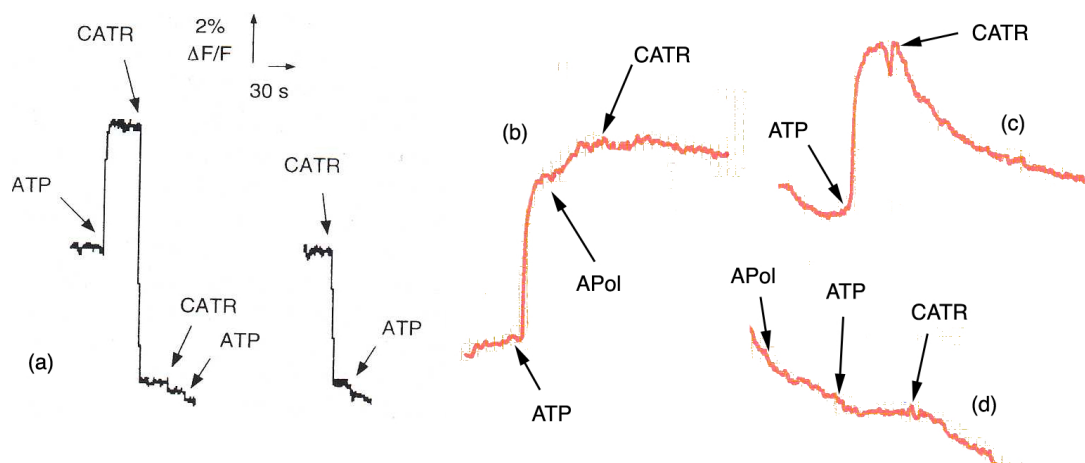


FIG. 3.4 – La présence d'amphipols supprime les changements de fluorescence intrinsèque lors de l'ajout d'ADP ou de CATR. A gauche (a) un tracé des variations de fluorescence intrinsèque de la littérature [Brandolin et al., 1993]. Nous observons des changements qualitativement semblables avec notre échantillon (en sortie de chromatographie AcA) en (c). Si on ajoute de l'amphipol en (b) et (d), on n'observe plus après ajout de variation de fluorescence. Les mesures sont faites avec une excitation à 297 nm et un enregistrement à 345 nm dans le tampon AcA en présence de 0,75% de glycérol. Les ajouts sont de 5 μ L d'ATP ou de CATR à 1 mM et de 4 g d'amphipol en poudre par gramme de protéine.

On ne peut pas tirer de conclusions d'expériences aussi préliminaires. Tout au plus peut-on émettre deux hypothèses. La plus positive imagine que l'absence de variations de fluorescence indique une stabilisation de la (des) conformation(s) des protéines en solution. La plus négative envisage une destabilisation de la protéine qui aboutit à un comportement semblable à celui d'une préparation qui attend trop longtemps à 4°C (trop longtemps signifiant ici une demi-journée).

Rétention sur colonne grâce à un amphipol biotinylé Avec un amphipol biotinylé, il est possible de retenir bAAC1 sur une résine Streptactine (IBA) tout comme sur une surface Biacore fonctionnalisée avec la streptavidine (figure 3.5). La quantité de protéine immobilisée sur la résine dépend fortement du temps d'incubation avec les amphipols ; et l'élution doit être optimisée. Toutefois cette approche semble prometteuse et mériterait d'être explorée.

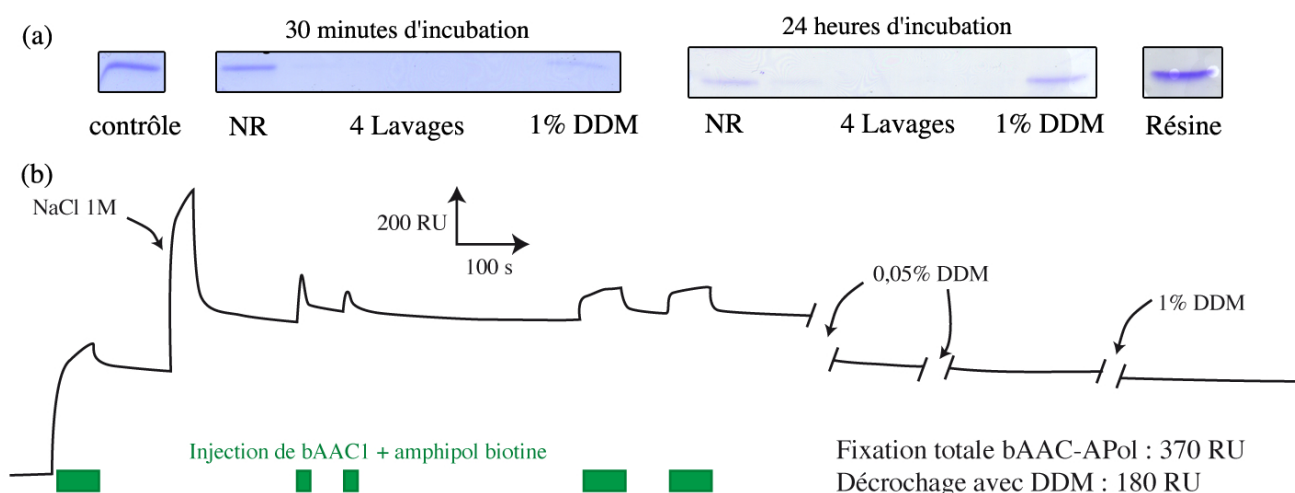


FIG. 3.5 – **Rétention d'un complexe protéine–amphipol biotinylé sur billes de streptactine et surface Biacore.** (a) Un gel d'électrophorèse montre la rétention d'une partie de la protéine sur une résine Streptactine en présence d'amphipol biotinylé (4 g/g). Une incubation de 30 minutes a lieu ; le mélange est ensuite incubé 30 minutes ou 24 heures avec de la résine streptactine (200 μ L de résine pour 0,1 mg de protéine). Après un lavage extensif dans quatre fois 2 mL de tampon, l'élution de la protéine est provoquée par un lavage dans 1% DDM. On observe bien la fixation de protéine sur la résine : 1. la piste NR pour non retenu est moins intense que la piste contrôle et 2. le dépôt de billes montre de la protéine fixée. Cette fixation est meilleure avec un grand temps d'incubation. L'élution est faible : une part importante de la protéine reste fixée au support. Elle n'est pas améliorée en doublant la quantité de détergent ou en employant le Lapao (non montré). (b) Fixation du complexe bAAC1-amphipol biotinylé sur une surface recouverte de streptavidine, mesurée en résonance plasmonique de surface. Les injections successives permettent d'observer une fixation du complexe. Après injection de DDM on a un décrochage partiel. L'injection de sel est une erreur.

3.2 Utilisation de partenaires protéiques

3.2.1 La cyclophiline D et VPR

Présentation de la cyclophiline D Les cyclophilines forment une famille ubiquitaire de protéines qui catalysent l'isomérisation *cis-trans* du lien peptidylproline. Elles interviendraient dans le repliement des nouvelles protéines [Galat, 1993]. Il existe un inhibiteur puissant de l'activité isomérase qui agit à des concentrations de l'ordre de 1 nM : la cyclosporine A. La cyclophiline D est le membre de cette famille présent dans la matrice mitochondriale. C'est une protéine soluble de 178 acides aminés.

Interaction de l'AAC avec la cyclophiline D Des travaux indépendants du groupe de Halestrap [Woodfield et al., 1998] et de Ward [Crompton et al., 1998] décrivent la mise en évidence directe de l'interaction entre la cyclophiline D et le transporteur d'ADP et d'ATP. Dans les deux cas, l'approche est identique : la cyclophiline D de rat est clonée puis exprimée avec une étiquette GST dans *E. coli*. Une fois la protéine fixée sur un support chromatographique, un extrait mitochondrial de foie de rat est appliqué. Après lavage, la cyclophiline D est éluée, et la fraction d'éluion analysée sur gel d'électrophorèse.

Les deux groupes identifient l'AAC dans cette fraction d'éluion par immunodétection, ce qui constitue une preuve directe de l'interaction avec la cyclophiline. Cette interaction est diminuée de 4/5 en présence de CATR et de 2/3 en présence de BA [Woodfield et al., 1998]. Les uns détectent également VDAC [Crompton et al., 1998], les autres non [Woodfield et al., 1998].

« L'efficacité » de la purification de l'AAC ainsi réalisée n'est pas quantifiée, mais la référence [Woodfield et al., 1998] montre un gel d'électrophorèse coloré à l'argent qui permet d'imaginer des applications comme la nôtre.

Présentation de Vpr Vpr est une petite protéine du virus HIV, de 96 acides aminés (14 kDa). On la trouve dans le sérum des individus séropositifs et dans la particule virale. Vpr participerait au transfert du complexe de préintégration dans le noyau de la cellule hôte et permettrait l'arrêt du cycle cellulaire des lymphocytes infectés. Cette protéine peut traverser les membranes biologiques.

Interaction de l'AAC avec Vpr L'induction de dysfonctionnements mitochondriaux et de l'apoptose par Vpr a d'abord été suggérée à partir de travaux sur des lymphocytes CD4⁺ humains présentant une chute du potentiel membranaire mitochondrial et une fragmentation de l'ADN après mise en contact avec la protéine virale.

Ensuite, une série d'articles du groupe de Kroemer [Ferri et al., 2000] [Jacotot et al., 2001] en collaboration avec le groupe de Roques [Sabbah et al., 2006] propose l'interaction directe de Vpr avec l'AAC. Ces travaux impliquent force techniques différentes, la rétention de l'AAC sur une résine fonctionnalisée avec Vpr et la résonance plasmonique de surface en sont deux piliers.

Les auteurs identifient le peptide 71-82 de Vpr comme responsable de l'interaction, avec une affinité évaluée à 1 nM, tandis que le segment 90-118 de l'AAC de rat serait celui sur lequel se fixe le peptide.

Le rôle des effecteurs de l'AAC est mis en avant : le BA nuirait à l'interaction alors que l'ATR la favoriserait.

3.2.2 Production et purification de la cyclophiline D bovine

Le clonage de la cyclophiline D bovine a été réalisé avec l'aide de Anne-Marie Di Guilmi. C'est finalement la protéine humaine avec laquelle nous avons conduit les essais d'interaction. En effet, les constructions réalisées avec la protéine bovine n'ont pas permis d'obtenir de cyclophiline D pure et correctement repliée.

La lecture de cette section n'est donc pas nécessaire à la compréhension de la suite. Je présente néanmoins les étapes du clonage et de la purification de la protéine bovine pour permettre de comprendre pourquoi nous nous sommes « rabattus » sur la protéine humaine.

3.2.2.1 Constructions réalisées (protocole page 162)

Nous avons acheté la cyclophiline D bovine à RZPD, qui est un fournisseur allemand, sous forme d'un insert contenu dans le vecteur pCMV-sport6. Le séquençage de cet ADN commercial met en évidence quatre mutations par rapport à la séquence théorique. Ces quatre mutations sont une substitution silencieuse et trois délétions. Ces dernières sont opportunément placées dans la même zone codant pour les douze derniers résidus de la protéine.

Deux ADNc (codant pour la protéine entière et tronquée en N-ter respectivement) ont été obtenus par PCR en utilisant le vecteur commercial comme matrice. Il a été long et difficile de réaliser cette amplification. Deux PCR successives (ou une unique incluant alors quatre amorces en quantités différentes) permettent : 1. de corriger les délétions côté 3', 2. d'ajouter les extrémités cohésives LIC² spécifiques des vecteurs de destination et 3. d'ajouter la séquence codant pour un site de coupure à la TEV en 5'.

Après préparation, par traitement avec l'ADN-polymérase T4, des inserts et des vecteurs pLIM ou pLx06 qui portent des séquences codant pour une étiquette histidine et GST respectivement, une hybridation suivie d'une transformation de souches DH5 α a permis d'obtenir trois constructions (figure 3.6)

3.2.2.2 Expression dans *E. coli*

Après transformation d'une souche BL21(DE3) de *E. coli*, qui permet l'expression de la T7 polymérase et donc des protéines sous contrôle du promoteur

²Acronyme de *Ligation Independent Cloning* [Aslanidis et de Jong, 1990], un système de clonage proposé par Novagen.

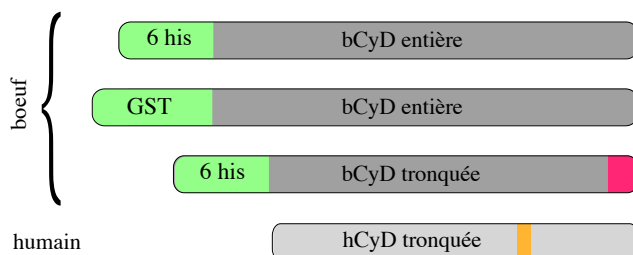


FIG. 3.6 – **Les différentes constructions protéiques de cyclophiline D utilisées.** Les trois constructions bovines n'ont pas permis d'obtenir de protéine pure, contrairement à la construction humaine. La zone rouge rappelle que dans la construction correspondante, les douze derniers résidus sont mutés à cause d'une mauvaise correction de mutations de la séquence de départ. La zone orange indique la mutation K133I nécessaire à la cristallisation de la cyclophiline D humaine. La zone tronquée N-terminale correspond aux résidus 1 à 12 de la protéine mature.

T7, l'expression des deux constructions étiquetées histidine s'est révélée décevante dans des conditions standards. En effet, si la surexpression est bonne, la quasi totalité de la protéine est exprimée sous forme insoluble.

Nous avons donc réalisé un test systématique de conditions d'expression à l'aide de la plateforme RoBioMol de l'institut. C'est Benoît Gallet qui a mené ce test à bien. Pour chacune des deux constructions histidines, nous avons fait varier la température d'incubation (20°, 27° ou 37°C), le temps de culture avant induction (jusqu'à atteindre une densité optique à 600 nm de 0,6, 1,2 ou 2), la concentration d'inducteur ([IPTG] de 0,1, 0,5 ou 1mM), et enfin le temps de culture après induction (six heures ou sur la nuit). Au total, 83 cultures différentes de 5 mL ont été testées.

De bonnes conditions d'expression de protéine soluble sont apparues. Étonnamment, les résultats obtenus avec le robot n'ont jamais pu être reproduits manuellement, même en utilisant un protocole rigoureusement identique (notamment une lyse chimique des bactéries en présence de détergent et de lysozyme).

Nous obtenons finalement une protéine majoritairement exprimée en corps d'inclusion dans *E. coli* (figure 3.7 à gauche).

3.2.2.3 Tentatives de purification

La première étape de purification est une chromatographie d'affinité pour le nickel. L'affinité entre le métal chélaté sur la résine et l'étiquette histidine permet fréquemment une séparation efficace de la protéine d'intérêt et des autres constituants cellulaires. L'élution se fait grâce à un gradient linéaire en concentration d'imidazole qui possède un noyau indole et donc une affinité pour le nickel comparable à celle de l'histidine.

Appliquée à la fraction soluble, cette chromatographie permet de récupérer une protéine difficilement détectable sur un gel d'électrophorèse coloré au bleu de Coomassie (figure 3.7 au centre). On note la présence de contaminants, notamment d'une bande vers 40 kDa. Un *western blot* dirigé contre l'étiquette histidine permet de détecter la protéine. Néanmoins son degré de pureté est insuffisant, sa quantité est très limitée, et elle subit une protéolyse rapide. Ces résultats peu encourageants nous ont incité à utiliser la protéine présente dans la fraction insoluble après lyse des bactéries.

Dans ce dernier cas, après solubilisation des corps d'inclusion dans un tampon contenant 6M d'urée, la chromatographie d'affinité permet d'obtenir une protéine abondante et pure (figure 3.7 à droite). Nous avons alors réalisé divers essais de renaturation : par dilution rapide, par dialyse, avec différents gradients de concentration d'urée pour la protéine fixée sur la résine nickel, en présence de glycérol ... **Aucun de ces essais n'a permis d'obtenir de protéine soluble après centrifugation.**

Nous avons également essayé de co-exprimer la cyclophiline bovine dans une souche de *E. coli* transformée avec un plasmide codant pour les chaperonnes GroEL et GroES. La proportion de protéine soluble n'était pas meilleure.

Nous nous sommes alors tournés vers la protéine humaine, pour laquelle l'expression, la purification et la cristallisation avaient été possibles avec succès [Schlatter et al., 2005].

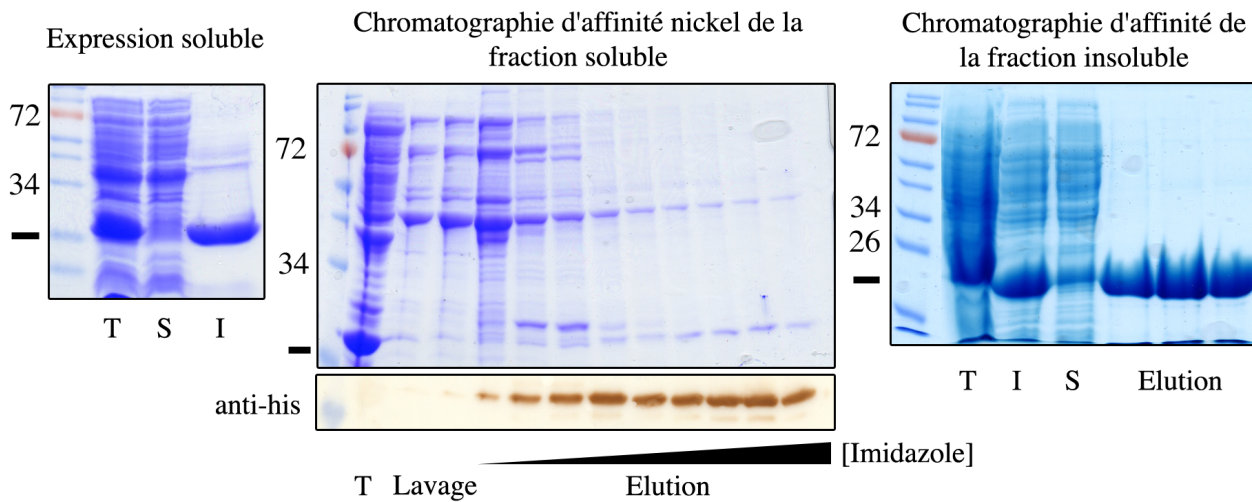


FIG. 3.7 – **Expression et essais de purification de la cyclophiline D bovine.** A gauche un gel d'électrophorèse de test d'expression dans les meilleures conditions identifiées. T est le lysat bactérien, S la fraction soluble et I la fraction insoluble. Au centre un gel d'électrophorèse et un *western blot* de chromatographie d'affinité nickel de la fraction soluble. A droite enfin cette même chromatographie pour la fraction insoluble reprise en urée. Le trait noir indique l'emplacement de la bande de la cyclophiline.

3.2.3 Production et purification de la cyclophiline D humaine (protocole page 164)

Le plasmide pET21 contenant l'insert codant pour la cyclophiline D humaine (hCyD_t) nous a été donné par Daniel Schlatter de l'entreprise Roche. La construction protéique correspondante est optimisée pour la cristallographie : les douze premiers acides aminés, sensibles lors d'essais de protéolyse par la trypsine, ont été supprimés ; la lysine 133 accessible à la surface a été mutée en isoleucine afin de favoriser les contacts cristallins [Schlatter et al., 2005].

Après transformation de la souche BL21(DE3) de *E. coli*, l'expression protéique est induite par ajout d'IPTG suivie d'une incubation de cinq heures à 30°C. La production est d'environ 15 mg par litre de culture.

Deux étapes de chromatographie d'échange d'ions permettent de purifier hCyD_t (figure 3.8 page suivante) : une première étape au cours de laquelle la protéine est éluée d'une résine SP-sépharose (GE lifescience) par un gradient de concentration en sel ; après dialyse, une seconde où elle n'est pas retenue sur une résine Mono-S (GE lifescience). Une dernière chromatographie d'exclusion de taille permet de changer le tampon de solubilisation, ainsi que de vérifier que la protéine est monodisperse et monomérique.

La protéine est concentrée jusqu'à 30 mg.mL⁻¹. De beaux cristaux sont obtenus à pH 7 par addition de 30 % de Jeffamine 2001 (figure 3.9).

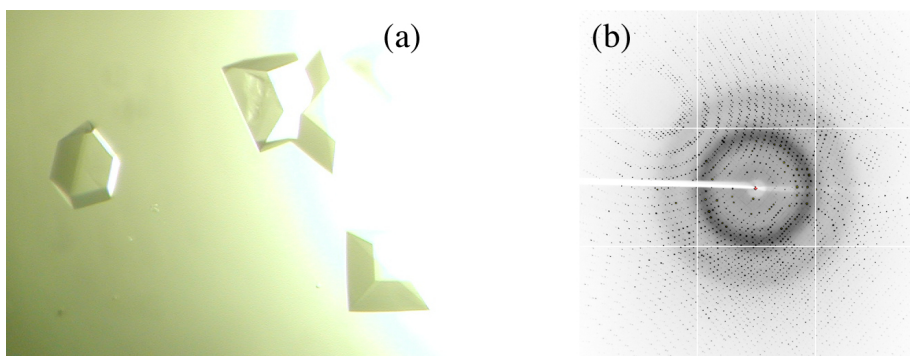


FIG. 3.9 – **Cristaux et diffraction de la cyclophiline D humaine.** (a) Un cristal de hCyD_t, de taille caractéristique 200 μ m. (b) Une image de diffraction de qualité exceptionnelle d'un tel cristal, la résolution atteint 1 Å.

Biotinylation non spécifique La fixation covalente non-spécifique de biotines sur hCyD_t est réalisée par l'ajout d'une biotine réactive portant un hydroxysuccinimide (NHS-Lc-Lc-Biotin de Pierce). Celle-ci possède la capacité de se fixer sur les groupements amines de la protéine, et vise en priorité les lysines. Une solution concentrée à 10 mg/mL de hCyD_t est mélangée avec une solution de DMSO contenant la biotine réactive. Le DMSO n'excède pas 20% du volume de réaction. Après trente minutes d'incubation, la réaction est stoppée

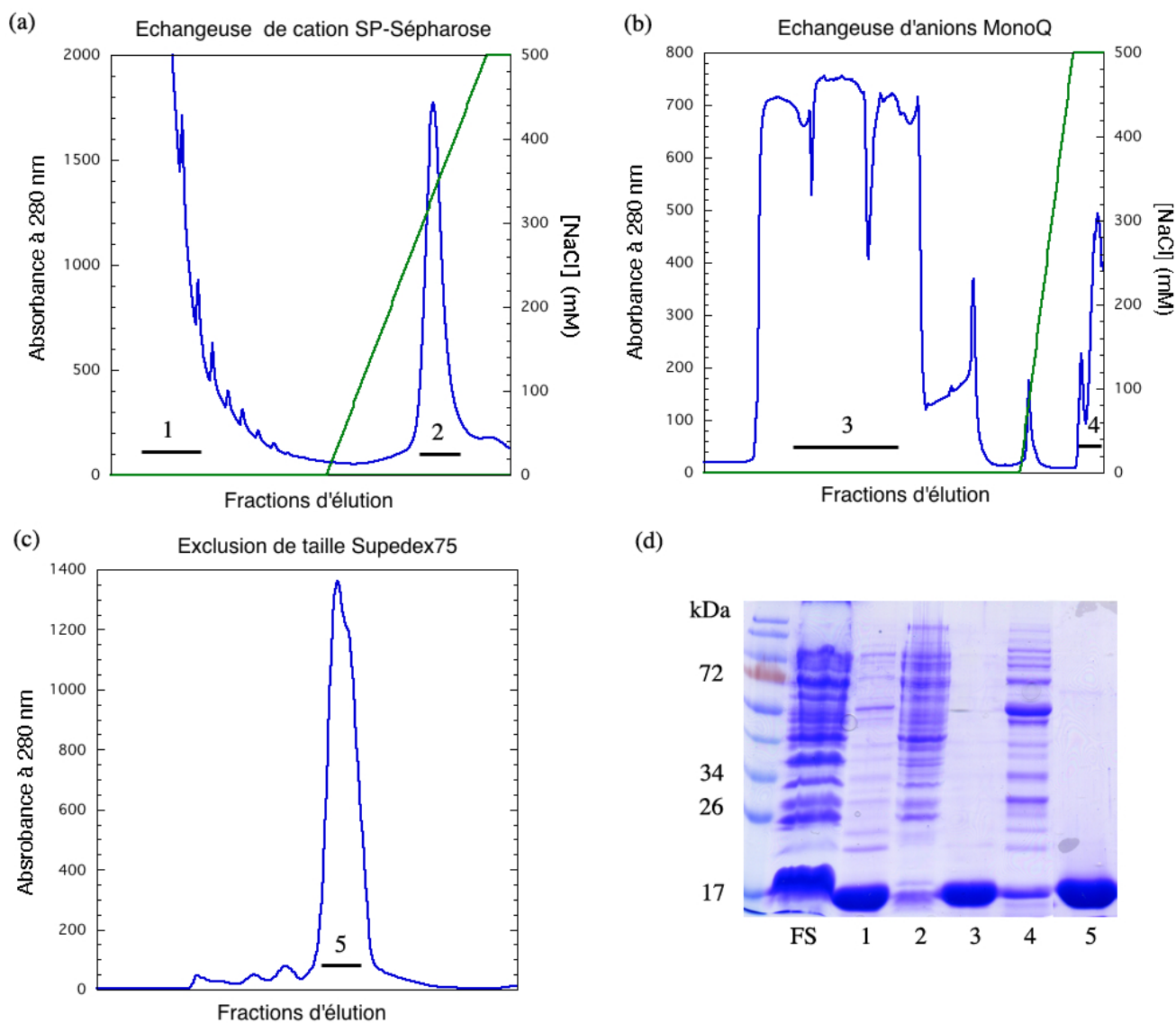


FIG. 3.8 – **Purification de la cyclophiline D humaine hCyD_t**. Les trois étapes de chromatographie d'échange de cations sur résine SP-Sépharose, d'échange d'anions sur résine MonoQ et d'exclusion de taille sur résine Superdex75 sont représentées. 15 μ L des fractions intéressantes ont été déposées sur gel d'électrophorèse. FS est la fraction soluble du lysat bactérien.

par ajout de Tris concentré. On peut évaluer le nombre de biotines fixées sur chaque molécule de hCyD_t par spectrométrie de masse ou à l'aide d'un dosage colorimétrique avec l'HABA. Ces méthodes nous ont permis de contrôler que la protéine porte plus d'une biotine en moyenne.

3.2.4 Peut-on expliquer la différence de comportement entre les constructions protéiques ?

Les séquences des cyclophylines D humaine et bovine sont identiques à hauteur de 91%. L'ajout d'une étiquette à la protéine humaine, tout comme le fait de ne pas tronquer l'extrémité N-terminale, empêche la cristallisation mais ne nuit pas à l'expression soluble. Il est donc difficile d'expliquer la différence de comportement entre les constructions humaines et bovines à partir de la comparaison des séquences. La figure 3.10 montre l'emplacement des résidus non identiques.

3.2.5 Choix du peptide de Vpr

Nous avons utilisé un peptide de synthèse (figure 3.11) correspondant aux acides aminés 71 à 88 de Vpr. Ce peptide comprend en effet le segment 71-82 qui a été identifié comme responsable de l'interaction avec l'AAC [Jacotot et al., 2001]. Une lysine a été ajoutée en C-ter afin de permettre le couplage covalent avec une biotine. Il n'est pas possible de sur-exprimer la protéine entière chez *E. coli* à cause de sa toxicité pour la bactérie. Nous avons mené des essais encourageants de production du seul peptide d'intérêt grâce à un vecteur développé à l'IBS par Isabel Ayala, spécifiquement pour l'expression de courts peptides. Toutefois, ces essais ont été interrompus devant l'absence d'interaction bAAC1-Vpr : nous n'avions plus besoin de grandes quantités de peptide, et celui de synthèse répondait à nos besoins.

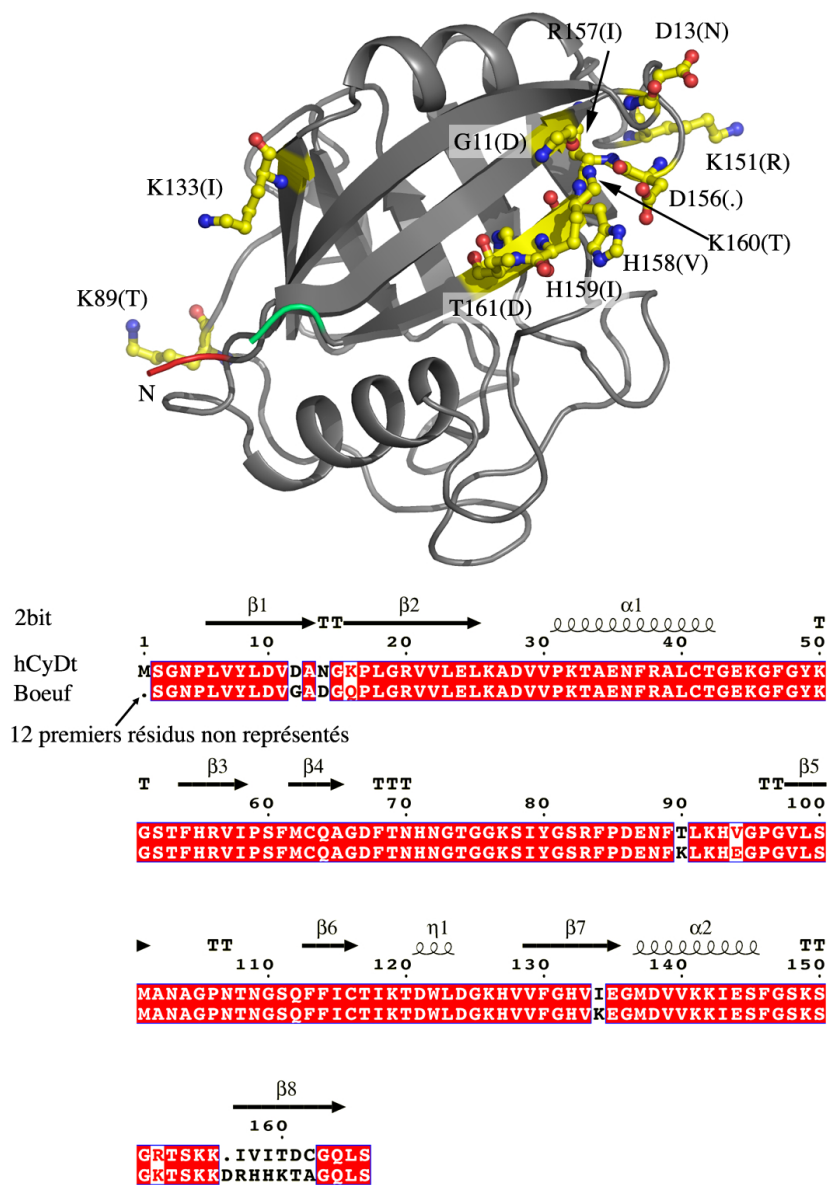


FIG. 3.10 – Comparaison entre les cyclophilines D humaine et bovine. En haut est représenté un modèle par homologie (SwissModel) de la cyclophiline D bovine à partir de la protéine humaine (code pdb : 2bit). Les résidus différents sont représentés par des bâtonnets. En bas figure l'alignement de séquences entre les deux protéines pour les constructions tronquées (les douze premiers résidus sont absents).

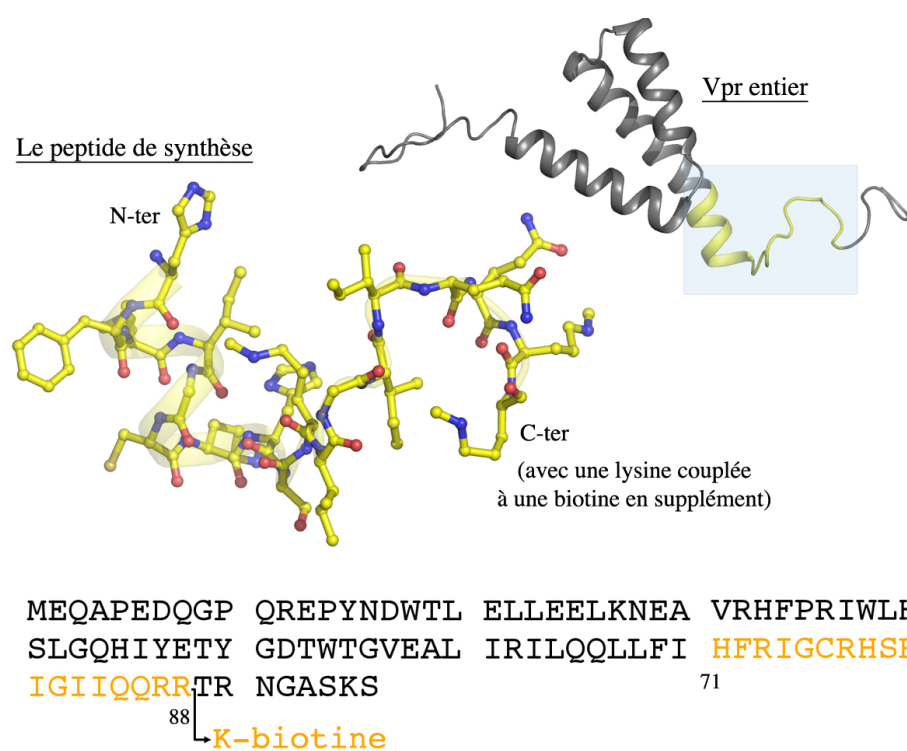


FIG. 3.11 – **Structure par RMN de Vpr et peptide utilisé.** La structure RMN de Vpr (code pdb : 1ml8) obtenu dans l'eau à pH acide est représenté en haut, et le peptide d'intérêt est montré en plus gros. En bas la séquence de Vpr d'HIV1, la séquence du peptide est en orange.

3.3 Quelles interactions avec le transporteur ADP-ATP ?

Cette section résume les essais d'interaction menés avec différents protocoles opératoires. Les résultats de l'ensemble de ces essais sont *plutôt* concordants : **dans les conditions expérimentales utilisées, nous ne mettons en évidence d'interactions ni entre bAAC1 et le peptide 71-88 de Vpr, ni entre bAAC1 et la construction hCyD_t de la cyclophyline D.**

3.3.1 Préparation des échantillons d'AAC

La préparation des échantillons de bAAC1 pour les tests d'interaction suit *grosso modo* le protocole habituel. Deux chromatographies après la solubilisation des mitochondries permettent d'obtenir une protéine pure dans un milieu contrôlé à une concentration proche de 0,1 mg/mL. Nous avons utilisé des échantillons solubilisés en Lapao (2% à la solubilisation puis 0,05% dans les tampons) et en Triton X100 (6% à la solubilisation puis 0,1% dans les tampons), en présence de CATR, de BA, d'ATP ou sans substrat. Le tampon le plus fréquemment utilisé est un tampon phosphate à pH 7,3.

3.3.2 Tests d'interaction

Il n'y a pas de rétention sur une résine fonctionnalisée avec Vpr ou hCyD_t Une résine streptactine (IBA) est incubée avec Vpr ou hCyD_t, qui se fixe sur les billes grâce à l'interaction entre la biotine qu'il porte et la streptactine du support. La résine est lavée, puis incubée en présence de bAAC1. Après un lavage extensif, le dépôt des billes sur un gel d'électrophorèse met en évidence l'absence de rétention de bAAC1 sur les billes fonctionnalisées avec la cyclophyline D dans nos conditions expérimentales (figure 3.12.a). Il y a une faible rétention sur les billes fonctionnalisées avec Vpr et dans l'expérience contrôle (figure 3.12.b).

Cette interaction faible ou absente est observée systématiquement dans les conditions testées : en présence d'ATP, de CATR, de BA ou en l'absence de ligand ; pour une protéine solubilisée en Triton X100 ou en Lapao ; à température ambiante comme à 4°C ; après une incubation des partenaires de 30 minutes ou d'une nuit.

Purification de bAAC1 incubé en présence de Vpr Des mitochondries sont resuspendues dans l'eau et incubées en présence d'un excès de Vpr sur glace. La protéine est ensuite purifiée comme d'habitude et en absence d'inhibiteur. Un test de rétention sur résine Streptactine et une détection de la biotine par *western blot* en sortie de chromatographie d'exclusion de taille sur résine Superdex200 sont réalisés. Ces deux tests confirment l'absence de Vpr copurifié dans les fractions contenant bAAC1 (résultats non illustrés).

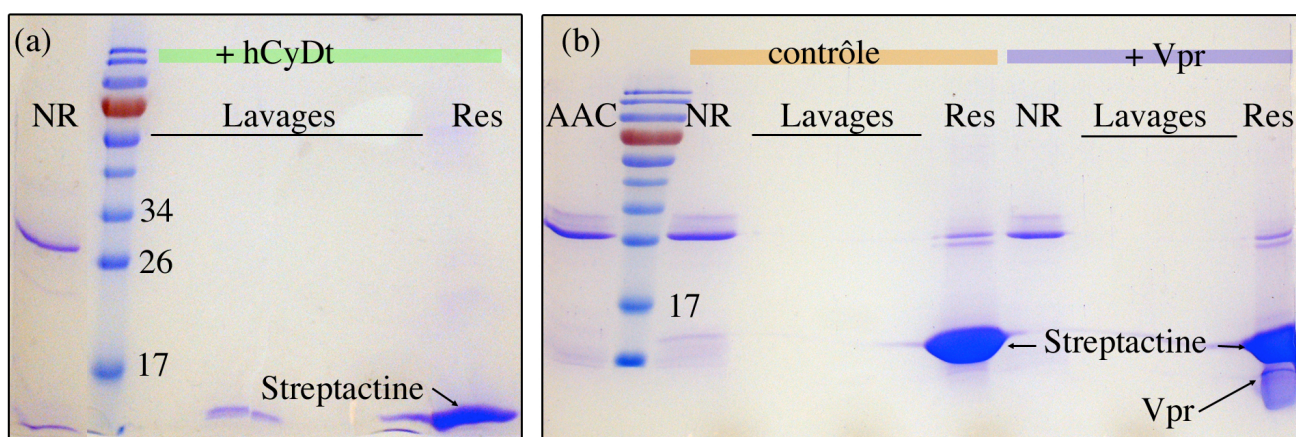


FIG. 3.12 – **bAAC1 n'est pas retenu sur une résine fonctionnalisée avec Vpr ou hCyD_t.** Un échantillon de bAAC1 (piste AAC) , la fraction non-retenue après incubation avec les billes (piste NR) , les fractions de lavage (pistes Lavages), et la résine après lavage (piste Res) sont soumis à une électrophorèse dénaturante. (a) Lorsque la résine est fonctionnalisée avec hCyD_t on n'observe pas de bande de bAAC1 dans le puit Res. (b) Lorsque la résine est fonctionnalisée avec Vpr comme dans le cas de l'expérience contrôle, on observe dans le puits Res. une bande faible indiquant la présence de bAAC1. L'intensité de cette bande est similaire dans les deux cas. Si on peut voir en (b) la bande de Vpr dans le puit Res, ce n'est pas le cas en (a) pour hCyD_t. On peut donc s'interroger sur la fixation effective de hCyD_t sur la résine. Néanmoins comment expliquer, si cette fixation n'a pas eu lieu, la différence par rapport à l'expérience contrôle qui montre une fixation non-spécifique sur la résine? Le résultat de (a) semble indiquer une fixation faible de hCyD_t qui suffit à empêcher l'interaction non-spécifique.

Passage d'un extrait mitochondrial sur une résine fonctionnalisée avec Vpr Un lysat mitochondrial de cœur de bœuf préparé avec 1% de Triton X100 est appliqué sur une résine de streptactine fonctionnalisée avec Vpr. Après lavage, il est impossible de détecter la présence de bAAC1 sur les billes (résultats non illustrés).

Elution différentielle de bAAC1 et de hCyD_t sur une chromatographie d'exclusion de taille Les protéines pures hCyD_t et bAAC1 en Lapao inhibée par le CATR sont mélangées. Après une heure d'incubation, l'échantillon est soumis à une chromatographie d'exclusion de taille. Les deux protéines sont éluées dans des fractions différentes (figure 3.13). Il n'y a pas d'interaction entre elles dans ces conditions.

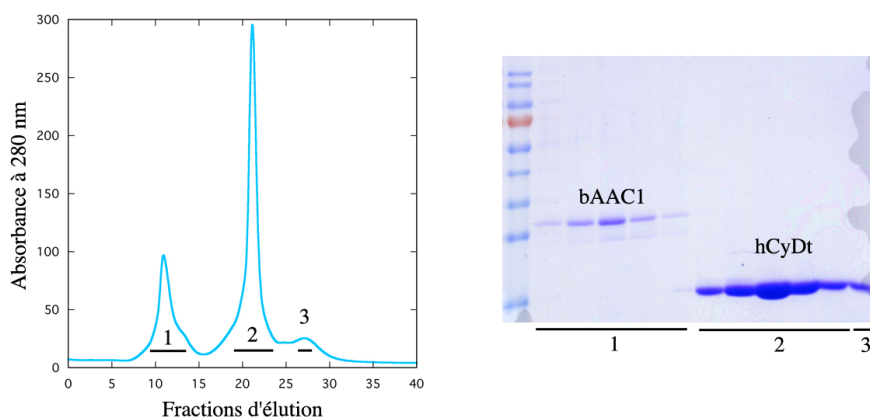


FIG. 3.13 – **Elution différentielle de hCyD_t et bAAC1 lors d'une chromatographie d'exclusion de taille.** A gauche le chromatogramme de l'élution sur colonne Superdex200 d'un échantillon de bAAC1 et hCyD_t mélangés. A droite le gel d'électrophorèse correspondant aux fractions intéressantes. On observe deux pics principaux d'élution, il n'y a pas de formation d'un complexe entre les deux protéines.

La résonance plasmonique de surface donne des résultats contrastés Des surfaces bio-actives fonctionnalisées avec Vpr ou hCyD_t sont préparées³. Vpr est immobilisée grâce à sa biotine C-terminale sur une surface de streptavidine ; hCyD_t est soit couplée directement à la surface via ses lysines de surface, soit par l'intermédiaire d'une interaction biotine-streptavidine. Nous n'observons pas systématiquement d'interaction avec les surfaces bio-actives lors de l'injection d'échantillons de bAAC1 (comparer par exemple la figure 3.14.a, où l'on ne voit pas d'interaction spécifique, et b, où elle existe). Lorsqu'une telle

³La description du principe de la résonance plasmonique de surface et de l'ensemble de nos résultats est proposée en annexe à partir de la page 165.

interaction est détectable, elle est faible et sa spécificité est sujette à caution. Nous n'observons pas non plus d'interaction lors de l'injection d'un mélange de détergent et de lipides mimant une membrane mitochondriale solubilisée (voir la figure page 3.14.e). Cette dernière expérience permet de vérifier l'absence d'une interaction non spécifique entre les lipides caractéristiques de la membrane interne et Vpr, qui est un peptide assez hydrophobe.

Les conditions de régénération des surfaces utilisées dans les travaux de Jacotot et al. [2001] ne permettent pas dans notre cas d'éliminer totalement la protéine injectée de la surface; on observe alors une déviation de la ligne de base qui rend délicate l'interprétation des courbes d'association (figure 3.14.c).

3.3.3 Discussion

Il est toujours plus délicat de présenter et de défendre des résultats négatifs que des résultats positifs. Ceux de nos tests montrent plutôt une absence d'interaction, tant entre bAAC1 et hCyD_t qu'entre bAAC1 et le peptide 71-88 de Vpr, dans les conditions utilisées.

Cette absence d'interaction ne peut être généralisée. L'implication commune de l'AAC et de la cyclophiline D dans le PTP est débattue, mais nos expériences, trop partielles, ne permettent pas d'enrichir ce débat. En revanche, il me semble clair que la question de l'usage des partenaires protéiques à des fins de purification est tranchée.

C'est la réponse à cette question –conjuguée au manque de temps– qui a servi de repère pour stopper les expériences. Bien sûr, si nous souhaitions rentrer dans la compréhension du rôle de l'AAC dans l'apoptose et prendre position sur l'existence et la composition du PTP, nos résultats devraient être prolongés, contrôlés. Ce n'était pas le but du projet initial, même s'il est aujourd'hui tentant de chercher pourquoi nous passons à côté d'interactions décrites comme extrêmement fortes (avec des constantes de dissociation de l'ordre du nanomolaire!).

Nous nous contenterons donc : 1. de constater l'impossibilité de purifier bAAC1 grâce aux constructions hCyD_t et à Vpr ; 2. de discuter rapidement et avec les précautions nécessaires des dissemblances entre nos résultats et ceux de la littérature.

Nous avons choisi des conditions expérimentales les plus proches possibles de celles décrites dans la littérature. Les protéines employées sont néanmoins différentes, et peut-être est-ce le point d'achoppement de nos expériences.

Ainsi les équipes de Ward et Halestrap utilisent la cyclophiline de rat, et de l'AAC extrait de foie du même animal (également scAAC2 dans le cas d'Halestrap). Le travail de Klingenberg en électrophysiologie montre une modulation de l'activité canal de l'AAC de *Neurospora crassa* par la cyclophiline du même organisme.

Concernant Vpr, les différences sont moins criantes puisque nous employons comme Jacotot ou Sabbah un peptide de synthèse, plus précisément le segment identifié par ces auteurs comme celui dont l'interaction avec l'AAC est la plus

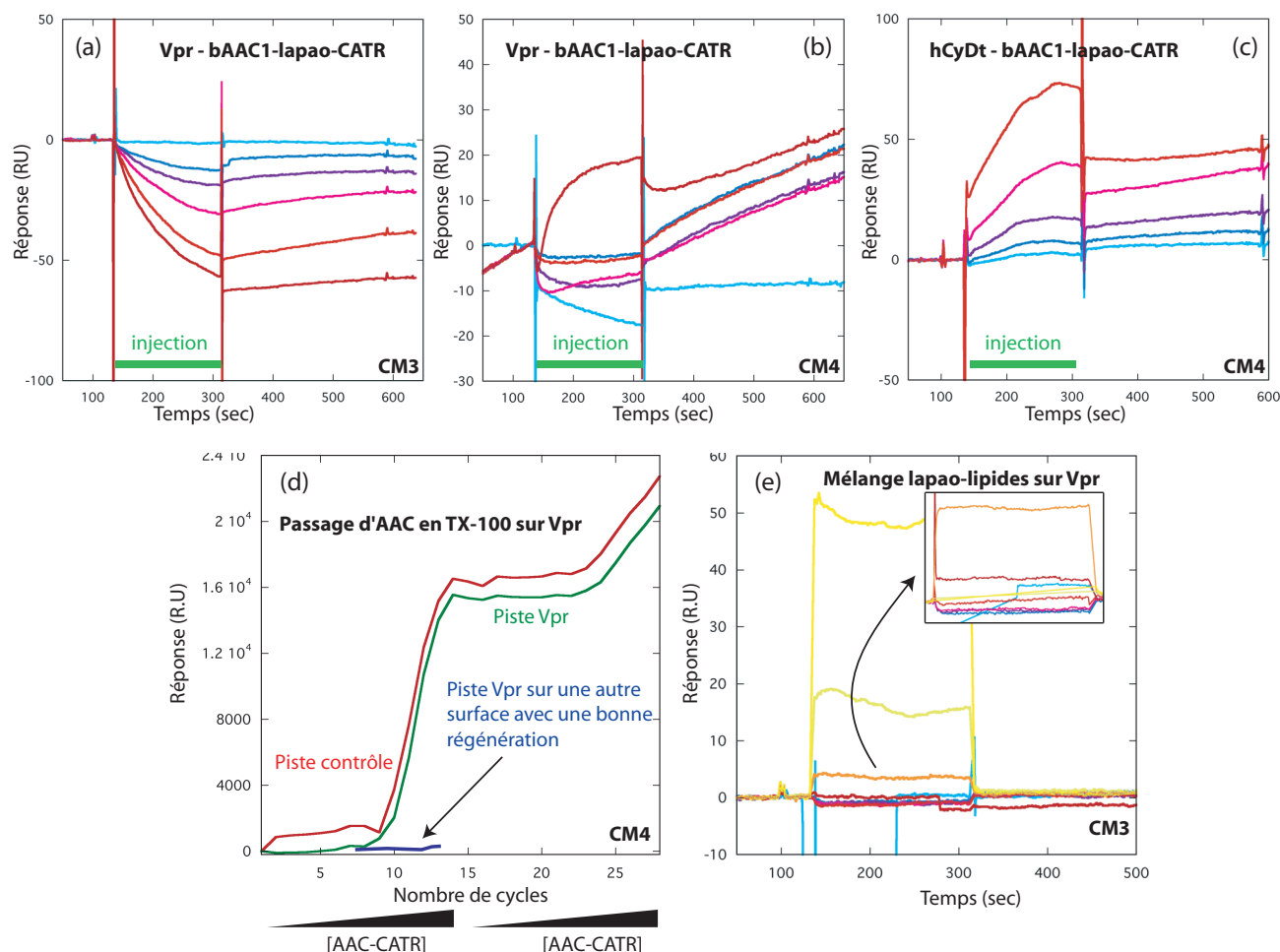


FIG. 3.14 – Mesures d'interaction par résonance plasmonique de surface. (a) Série d'injections de bAAC1 inhibée par le CATR et solubilisée en Lapao à concentrations croissantes; la fixation est plus forte sur la piste contrôlée que sur celle fonctionnalisée avec Vpr. La surface est de type CM3. (b) Série d'injections de bAAC1 inhibée par le CATR et solubilisée en Lapao à concentrations croissantes; la fixation est plus forte sur la piste fonctionnalisée avec Vpr. La surface est de type CM4. (c) Série d'injections de bAAC1 inhibée par le CATR et solubilisée en Lapao à concentrations croissantes; la fixation est plus forte sur la piste fonctionnalisée avec hCyDt. La surface est de type CM4. (d) Evolution de la ligne de base lors de séries d'expériences, la courbe représente la réponse absolue en début de chaque cycle. On constate une mauvaise régénération et une très forte fixation de matériel sur la surface avec les conditions de régénération de [Jacotot et al., 2001]. (e) Absence d'interaction entre un mélange de Lapao et de lipides mimant la membrane interne et une surface fonctionnalisée avec Vpr. Les détails expérimentaux sont précisés en annexe à partir de la page 165.

forte. Dans leurs travaux cependant, l'AAC utilisé était extrait de foie ou de cœur de rat.

Si on laisse de côté pour le moment le problème de l'origine des protéines, il est difficile d'imaginer que nous passons à côté des interactions décrites. En effet, nous travaillons avec des protéines purifiées dont la qualité est assurée. Il est peu probable que nos résultats négatifs proviennent d'une mauvaise pureté, d'un mauvais état des différentes protéines.

Le protocole de purification de bAAC1 est celui d'un laboratoire dont l'expérience avec cette protéine est supérieure à celle des équipes travaillant sur le PTP, et ce protocole permet d'obtenir des cristaux. La cyclophiline D est purifiée selon un protocole connu, on peut la cristalliser. Nous n'avons pas répété le test d'activité, long à mettre en oeuvre, qui donne de bons résultats avec cette construction. Enfin concernant Vpr, il s'agit d'un peptide de synthèse dont la pureté et la composition ne font pas de doute.

Les AAC des travaux de la littérature sont purifiées sur hydroxylapatite puis par chromatographie d'échange d'ions à partir de mitochondrie de cœur ou de foie de rat. Les protocoles sont convaincants, bien qu'ils apportent peu de précisions quant au délai entre la purification et les expériences d'interaction⁴. Ils sont en général décrits dans des productions antérieures des mêmes laboratoires. L'absence de contamination par VDAC est contrôlée par immunodétection.

Je pense qu'on peut également exclure les arguments invoquant la différence de conception des tests d'interaction. Nos protocoles ressemblent fortement à ceux de la littérature. Les différences (notamment l'emploi d'une résine streptactine et non d'une résine GST, l'emploi de Lapao ou de Triton X100 plutôt que de CHAPS) ne permettent pas à elles seules d'expliquer les résultats opposés.

Ne restent alors que deux types d'explications. Le premier, on l'a dit, suppose que nos constructions se prêtaient mal à une interaction : c'est concevable pour la cyclophiline, plus difficilement pour Vpr. Le second revient à mettre en cause la réalité de ces interactions, ou du moins à mettre en cause leur intensité. Je n'ai pas d'explications solides, ni surtout d'expériences répétées, diverses, pour nuancer les travaux sur lesquels nous avons basé notre projet. Je suis néanmoins persuadé que si ces interactions existaient telles que décrites, nous les aurions vues lors des tests de rétention, et mises en évidence en SPR sans aucune place pour le flou et le doute.

Les expériences de SPR de la littérature peuvent d'ailleurs être remises en cause. D'une part les conditions de régénération des surfaces évoluent entre le premier et le second article. D'après nos expériences, la régénération en présence de 1M NaCl est incomplète, et l'augmentation du signal de SPR ne peut être directement corrélée à une interaction avec Vpr dans ce cas. D'autre part, dans

⁴Des semaines, des mois voire des années pour certaines expériences. A. Deniaud, communication personnelle

le travail le plus récent, les auteurs indiquent ne pas avoir pu travailler à une concentration supérieure à $1,5 \mu\text{M}$ d'AAC, soit environ $0,05 \text{ g/L}$ pour des raisons de solubilité de l'AAC. Il est étonnant que dans un milieu et dans un état adéquat, la protéine agrège à cette concentration, alors que bAAC1 en Lapao est soluble à 5 g/L (une concentration cent fois supérieure).

Enfin mes propres expériences de SPR ne sont pas faciles à interpréter (voir l'annexe page 165). En effet des expériences ressemblantes ou semblables ont pu donner des résultats différents et parfois contradictoires. Nous ne savons pas analyser certains de ces résultats. Il me semble donc que la mise en évidence de l'interaction par cette méthode doit être considérée avec une grande prudence.

Chapitre 4

Cristallisation des protéines membranaires

Les frontières des compartiments cellulaires et de la cellule sont constituées de bicouches de lipides que traversent des protéines membranaires. Il est commun de souligner à la fois l'importance de cette classe de protéines, et la difficulté de leur étude. Nous brossons le portrait de ce champ de recherche dans une première section.

La nécessité d'employer des tensio-actifs, le plus fréquemment des détergents, est le trait singulier de l'étude structurale des protéines membranaires. Les présenter puis souligner leur rôle dans le processus de cristallogenèse est l'objet de la deuxième section.

Le reste du chapitre rapporte deux expériences utilisant des méthodes qui s'appuient sur la spécificité des protéines membranaires : la cristallisation en présence d'un champ magnétique, et la détection des cristaux par diffraction dans une phase cubique de lipides.

4.1 L'étude structurale des protéines membranaires

On évoque souvent la part du génome codant des protéines membranaires –comprise entre 12% et 30% suivant la méthode d'évaluation et l'organisme concerné [Wallin et von Heijne, 1998, Boyd et al., 1998, Arai et al., 2003]– et la part des médicaments dont la cible est une protéine membranaire –de l'ordre de 70 % [Drews, 2000]–. La difficulté de leur étude, accentuée dans le domaine structural, regroupe à la fois les difficultés de production, notamment de surexpression, et de manipulation des complexes protéines–détergents–lipides. Citons deux statistiques : environ 15% des protéines de fonction connue dans la base de données *Swissprot* sont membranaires ; environ 0,6% des protéines de structure connue dans la PDB sont membranaires.

4.1.1 Etat des lieux des connaissances structurales

En mars 2007, le site de S. White¹ recense 250 structures de protéines membranaires relatives à 124 protéines différentes, soit 0,58% de la totalité des entrées de la PDB².

D'après S. White, la progression du nombre de structures connues pour cette classe de protéines est exponentielle, et on peut comparer la connaissance structurale actuelle des protéines membranaires avec celle des protéines solubles une trentaine d'années en arrière, bien que l'évolution soit légèrement plus lente [White, 2004].

De l'analyse de la liste des structures connues ressortent quelques statistiques intéressantes : la résolution est en moyenne moins élevée que dans l'ensemble de la PDB (2,5 Å contre 2,2 Å). L'empilement souvent problématique des couches dans les cristaux dits de type I ainsi que la présence de structures à moyenne résolution obtenues par microscopie électronique ont un impact sur cette résolution moyenne.

Les protéines repliées en tonneaux β sont sur-représentées (environ 20% des protéines polytopiques). Le nombre de protéines provenant d'un organisme dans lequel elles sont naturellement abondantes (environ 33%) illustre les difficultés d'obtention du matériel biologique par surexpression. La souche bactérienne *E. coli* reste l'organisme de référence pour la production de protéines recombinantes (environ 40% du total).

La cristallographie est la méthode la plus usitée, largement devant la RMN. Une majorité des cristaux est obtenue en diffusion de vapeur. Notons l'emploi de méthodes ou de variations particulières pour les protéines membranaires dans quelques cas : croissance en phase cubique de lipides pour cinq protéines [Pebay-Peyroula et al., 1997, Royant et al., 2001, Luecke et al., 2001, Kolbe et al., 2000, Katona et al., 2003, Cherezov et al., 2006a], utilisation de bicelles pour la bactériorhodospine [Faham et Bowie, 2002], utilisation d'anticorps monoclonaux (pour revue voir Hunte et Michel [2002]), ou ajout de lipides exogènes [Toyoshima et al., 2000, Kurisu et al., 2003, Liu et al., 2004].

La recette : un peu d'heptane-triol avec du PEG pour cristalliser une protéine en DDM A l'aide du site de H. Michel³ qui recense les conditions de cristallisation des protéines membranaires polytopiques (mais qui n'est plus mis à jour), on constate un usage important des β -D-glucopyranosides (octyl- ou nonyl-) et des β -D-maltosides (avec une préférence pour le dodécyl-). On remarque traditionnellement que les micelles des premiers sont petites, et leur

¹blanco.biomol.uci.edu/membrane.proteins_xtal.html

²Ce décompte varie suivant la définition adoptée pour considérer une protéine comme membranaire. La PDB dénombre ainsi 837 structures dans cette catégorie, là où le site de M. Caffrey (www.mpdb.ul.ie) en répertorie 726 dont 175 différentes. Les variations sont dues essentiellement à la prise en compte de peptides et de protéines monotopiques, ou de protéines membranaires dont seul un domaine soluble est connu. C'est donc S. White qui propose les chiffres les plus pertinents

³www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html

CMC élevée, ce qui peut favoriser respectivement les contacts cristallins et le bon contrôle de leur concentration ; à l'inverse, les seconds sont plus doux, moins dissociants. On peut également noter l'emploi fréquent des PEG, particulièrement des PEG 400, 4000 et MME 2000.

Pour autant, il n'existe pas de conditions de cristallisation archétypiques. De plus, la seule donnée des conditions finales reflète très mal le processus qui conduit à la résolution de structure. En effet les histoires des résolutions de structure sont souvent longues, complexes, avec de longues phases sans résultats entrecoupées de séquences charnières, et toujours nourries par les allers-retours entre cristallogénèse et biochimie en aval. La narration de ces histoires est plus riche d'enseignements que toutes les statistiques de cristallogénèse. C'est pourquoi nous détaillons l'une d'elles ci-dessous

Etapes clés de l'obtention de la structure de l'antiport sodium–proton

La structure de ce transporteur de *E. coli* primordial dans l'adaptation à un milieu salin a été obtenue en 2005 dans le groupe de C. Hunte [Hunte et al., 2005]. La narration du processus qui a permis cette réussite fait l'objet d'une seconde référence très intéressante [Screpanti et al., 2006]. La protéine produite par sur-expression homologue chez *E. coli* est purifiée en une seule étape de chromatographie d'affinité via une étiquette histidine. La seconde étape de chromatographie d'exclusion de taille est rapidement éliminée pour éviter un lavage et une délipidation excessive. Les premiers tests de cristallisation mettent en évidence l'influence positive des petits PEG et du magnésium (cristaux diffractant à 12 Å), et le pH doit être acide pour bloquer une conformation de la protéine. L'affinement de ces conditions permet de déterminer un intervalle étroit de pH (< 0,2 unités) et de température (< 2°C) qui donne des cristaux plus gros (diffractant à 10 Å). Pour limiter les dommages liés à la manipulation, du saccharose est intégré à ce stade aux conditions de cristallisation, permettant une congélation directe.

Deux étapes successives de tests de détergents sont ensuite mises en place. Tout d'abord, le détergent de solubilisation est échangé sur la colonne d'affinité. Parmi les dix détergents testés, le passage en α -DDM permet un changement de forme cristalline (cristaux diffractant à 7 Å). L'ajout d'un second détergent comme additif à la cristallisation montre que la présence de β -OG donne des cristaux plus gros (diffractant à 4 Å). A ce stade, et devant l'impossibilité de collecter des données exploitables, un contaminant est détecté dans la préparation protéique. Ce problème est résolu en changeant de souche d'expression pour adopter la souche RK20 dépourvue du transporteur sodium-proton. Dans les conditions précédentes (α -DDM et β -OG, PEG 400, MgCl_2 , 6°C), les cristaux diffractent à 3,45 Å et la structure est résolue.

Au final cinq cents cristaux ont été testés au synchrotron et environ un sur trente présentait une diffraction au-dessus du lot.

L'histoire particulière de cette résolution de structure met en lumière certains critères généraux de réussite déjà évoqués. Le matériel de départ semble propice à un projet fructueux : une protéine **abondante**, dotée d'une étiquette, et la

possibilité de **bloquer une conformation** (en jouant sur le pH). La purification est rapide, les manipulations réduites (cryoprotectant intégré aux conditions de cristallisation). Le **contrôle de l'environnement** est crucial, il passe par le choix du type et de la quantité des détergents adéquats. Malgré un contrôle strict de nombreux paramètres, il subsiste une **variabilité** des cristaux, et comme ceux-ci sont petits et/ou mauvais, l'accès régulier à une source de rayonnement synchrotron est essentiel. Enfin, le temps du projet, qui n'est pas directement cité dans la référence, est important.

4.1.2 Contours du domaine de recherche

La communauté scientifique montre un intérêt pour l'étude structurale des protéines membranaires. Deux paramètres permettent de l'apprécier : la notoriété des journaux dans lesquels se publient les nouvelles structures⁴ et le financement des programmes de recherche spécifiques. Par exemple, le nouveau laboratoire dirigé par So Iwata, à proximité du synchrotron Diamond, a reçu un financement de £1,7 millions. Plusieurs programmes européens sont également centrés autour de cette thématique.

Nous avons vu que cet intérêt, renforcé peut-être par un effet de mode, s'appuyait sur deux causes : une relative méconnaissance structurale par rapport aux protéines solubles (elle-même issue de la difficulté des projets) et l'importance supposée pour la santé des protéines membranaires.

Pour financer ses travaux –ou simplement parfois pour intéresser son entourage!– le chercheur est parfois amené à décrire ses projets selon un angle de vue particulier : celui de l'impact en santé humaine. Il existe en effet une attente sociétale vis-à-vis de la recherche médicale, systématiquement citée comme le premier besoin en recherche lors des enquêtes auprès de la population. Cette attente se traduit, avec des modalités variables, dans les dotations sectorielles. Aux Etats-Unis, le NIH dispose ainsi de la moitié des fonds alloués à la recherche par le pays⁵.

Pour répondre à cette attente, dans le cas très particulier de la biologie structurale des protéines membranaires, le discours peut suivre un argumentaire séducteur en deux points :

- les médicaments ciblent souvent des protéines membranaires,
- la connaissance de nouvelles structures va permettre le développement de nouveaux médicaments.

C'est au niveau de ce second point que peut intervenir un biais du discours. Formulé en d'autres termes, il y a une part d'incantation dans le discours scientifique à usage promotionnel, celui de la première page d'un dossier de financement, ou d'un *abstract* rappelant les implications thérapeutiques de la recherche conduite.

⁴Par exemple 80 références dans *Science* et 79 dans *Nature* pour ne citer que ces deux journaux généralistes.

⁵Ce sont les chiffres pour 2003 ; en France la part de la recherche médicale était de l'ordre de 8% en 1998 d'après une estimation de l'OST. Il est intéressant de noter aussi la part importante de crédits destinés à la lutte contre le bio-terrorisme aux Etats-Unis (autour de 4% de ce dont dispose le NIH).

Historiquement, la découverte de nouveaux médicaments s'appuie sur des essais extensifs et laisse une place au hasard. L'approche rationnelle dite du *structure-based drug design* a néanmoins conduit à la commercialisation des composés suivants :

- la dorzolamide, un inhibiteur de l'anhydrase carbonique, utilisé en solution dans le traitement du glaucome ;
- le zanamivir (nom de spécialité *Relenza*), un inhibiteur de la neuraminidase, utilisé comme antiviral dans le traitement de la grippe ;
- l'enfuvirtide (nom de spécialité *Fuzeon*), un peptide antirétroviral, utilisé dans les trithérapies pour combattre l'infection par le virus du sida. Il empêche la fusion du virus avec la cellule hôte.

Aucune de ces molécules n'interagit directement avec une protéine membranaire. Et les fruits des efforts importants portés par exemple sur l'étude des GPCR à partir de la structure de la rhodopsine bovine ne sont pas encore mûrs.

Peut-on alors dire que la recherche structurale dans le domaine des protéines membranaires est un thème porteur, important pour les connaissances et les développements méthodologiques qu'il apporte, mais dont les retombées thérapeutiques directes restent aujourd'hui chimériques ? Laissons cette question ouverte et revenons à notre sujet scientifique pour présenter quelques caractéristiques des tensio-actifs.

4.2 Tensio-actifs, détergents et cristallogénèse

4.2.1 Les molécules tensio-actives

La plus célèbre mise en évidence d'un tensio-actif est l'expérience de Benjamin Franklin. Il verse une goutte d'huile à la surface d'un étang, et observe son étalement remarquable (on distingue la zone couverte par l'huile à l'absence de vaguelettes créées par le vent) : la couche (monomoléculaire) d'huile recouvre une surface de près de 100 m². Cette capacité d'adsorption à la surface peut servir de définition : on appelle tensio-actifs les constituants qui ont la propriété de modifier une tension interfaciale. La structure moléculaire des tensio-actifs explique cette propriété : ils possèdent à la fois une tête hydrophile, polaire ou chargée, et une queue hydrophobe, souvent une chaîne aliphatique.

La distinction entre tensio-actifs et détergents est d'ordre fonctionnel : un détergent est capable d'enlever des salissures. Cela se reflète souvent sur sa structure par un équilibre entre les parties hydrophiles et hydrophobes dominé par la tête hydrophile. Pour l'étude des protéines membranaires, les tensio-actifs utilisés sont très fréquemment détergents, afin de pouvoir solubiliser les membranes biologiques.

Le choix d'un détergent approprié, son utilisation à la concentration adéquate, sont des paramètres fondamentaux qui conditionnent la solubilité de la protéine, sa stabilité, le maintien de sa fonction et de son organisation oligomérique.

Les tensio-actifs s'organisent en micelles et forment des agrégats Les micelles sont des agrégats globulaires de molécules tensio-actives. Elles ne sont qu'un des types d'assemblées que peuvent former ces molécules (voir à ce propos le livre *Intermolecular and surface forces* de J. Israelashvili). L'existence de ces structures organisées provient de l'équilibre entre le rapprochement des chaînes aliphatiques, énergétiquement favorable, et la répulsion des têtes polaires. Les micelles peuvent être de formes et de tailles variables. Le nombre d'agrégation (le nombre de molécules qui forment une micelle) est une variable difficile à caractériser qui dépend des conditions expérimentales.

Les micelles apparaissent lorsque la concentration en détergent dépasse une valeur seuil appelée CMC (acronyme de concentration micellaire critique). La nature et la taille de la tête polaire comme la longueur des chaînes aliphatiques influent sur la CMC⁶.

Dans le cas de mélanges complexes détergent-lipides-protéines, on continue souvent d'utiliser les notions de micelles et de CMC bien qu'elles ne soient pas les meilleurs descripteurs des assemblées moléculaires. En effet, le détergent semble s'organiser plutôt en une monocouche autour des protéines membranaires.

Il est commun de rappeler que la taille de la « bouée » de détergent ne doit pas empêcher les contacts entre complexes protéiques et que se placer légèrement au-dessus de la CMC est favorable lors des essais de cristallisation.

Comment choisir le bon détergent ? Ce choix est largement empirique. La physico-chimie peut nous apprendre que tel tensio-actif forme tel type d'agrégats, de micelles, mais ne permet par exemple ni de prévoir, ni d'expliquer pourquoi le Lapao permet une bonne solubilisation de bAAC1, de faibles pertes lors de la chromatographie sur hydroxylapatite, et la formation de cristaux en présence de Jeffamine. L'expérience accumulée par les biochimistes indique que les détergents purs non-ioniques « doux » possédant une chaîne carbonée de 8 à 14 carbones sont adaptés à la manipulation des protéines membranaires.

Une méthode parmi d'autres peut être la suivante [Odahara, 2004] : commencer par fixer la taille de la chaîne acyle à partir de la composition lipidique de la membrane. En effet il faut que les zones hydrophobes de la protéine et du détergent se correspondent, et la longueur moyenne des chaînes lipidiques est le meilleur indicateur pour deviner cette correspondance⁷. Ensuite, le type de tête polaire peut être fixé à l'aide d'un test de stabilité. Un test fonctionnel est idéal, le maintien en solution de la protéine pendant plusieurs jours est un bon indicateur. Si plusieurs détergents sont équivalents, on peut supposer accroître ses chances en choisissant celui de plus haute CMC, et formant les micelles les

⁶A titre d'exemple, pour une même chaîne à douze carbones, voici les CMC de différents détergents (mM) : SDS 12 mM, LDAO autour de 1 mM, C₁₂E₂ 0,033 mM, C₁₂E₄ 0,064 mM, C₁₂E₈ 0,1 mM, C₁₂E₁₂ 0,14 mM, β -D-glucopyranoside 0,19 mM, β -D-maltoside 0,18 mM. De manière symétrique, pour une même tête polaire β -D-maltoside, voici les CMC des détergents de différentes longueurs de chaînes : C8 19,5 mM, C9 6 mM, C10 1,6 mM, C11 0,59 mM, C12 0,18 mM, C13 0,033 mM, C14 0,012 mM. Source : thèse de D. Stroebel.

⁷Cela revient à appliquer une sorte de règle de trois entre la longueur des chaînes lipidiques (entre 14 et 24 carbones) et de celles du détergent (entre 8 et 14)...

plus petites.

4.2.2 Autour de la cristallogénèse

Essais par diffusion de vapeur, aspects pratiques La technique la plus courante de cristallogénèse est dite de diffusion de vapeur, avec ses déclinaisons en goutte assise ou suspendue. Pour les essais réalisés au laboratoire, j'ai utilisé des plaques 24 puits (Limbrow ou Nextal Quiagen⁸) avec des gouttes suspendues, d'un volume initial de 2 μ L. Les essais robotisés utilisent des plaques 96 puits (Greiner) avec gouttes assises ou suspendues d'un volume compris entre 100 nL et 2 μ L. A l'IBS nous avons accès à un robot Tecan placé dans l'Institut capable de réaliser des micro-gouttes et à un robot Cartésien placé au CIBB, capable de réaliser des plaques avec des nano-gouttes.

C'est presque uniquement ce robot Cartésien que nous utilisons. L'équipe de la plateforme qui l'opère a mené des développements technologiques appréciables : possibilité de travailler en gouttes suspendues, visualisation des plaques via internet, remplissage personnalisé, etc. . . Néanmoins, l'usage des robots impose deux contraintes principales : il faut réserver un créneau –pas toujours immédiat– pour faire ses plaques, ce qui peut poser problème avec une protéine instable, et il faut transporter les plaques en voiture sur quelques centaines de mètres, avec toutes les secousses thermiques et mécaniques qui accompagnent le trajet. C'est pourquoi nous laissons nos plaques s'équilibrer, les inspectons sur place puis seulement les rapportons au laboratoire.

Nous disposons à l'IBS de la plupart des kits commerciaux de conditions de cristallisation. Six kits supplémentaires de 96 conditions chacun, conçus au laboratoire, explorent des conditions adaptées aux protéines membranaires. J'ai aussi utilisé régulièrement un kit personnel centré autour des PEG et alcools de petite masse moléculaire, conçu à partir des résultats de cristallogénèse de bAAC1.

Précipitant, protéine, détergent, une pièce à plusieurs acteurs On décrit usuellement la cristallisation en faisant appel au diagramme de phase du système protéine–précipitant : les concentrations de la protéine et du précipitant adéquat sont choisies telles qu'on se place sur le diagramme au-dessus de la courbe de solubilité, dans la zone de nucléation (figure 4.1.a). Avec de nombreux essais et de la chance, un cristal apparaît.

On peut également décrire le comportement d'un détergent en solution grâce à un diagramme de phase dont la figure 4.1.b. donne l'allure générale.

Par contre la description du système complet (le complexe protéine–lipides –détergent, les micelles libres, le précipitant, les sels. . .) manque. La cristallogénèse des macromolécules est tout autant une technique qu'une science, dans la

⁸Les plaques Quiagen présentent l'avantage d'utiliser un couvercle avec un pas de vis, très pratique lorsqu'il est nécessaire d'accéder plusieurs fois à la goutte. L'état de surface de la lamelle de verre silanisé est par contre meilleur pour les lamelles Hampton s'adaptant sur les plaques Limbro. Certaines gouttes contenant du détergent s'étalent énormément sur les couvercles Quiagen mais gardent une forme correcte sur les lamelles Hampton.

mesure où sa rationalisation est incomplète et où elle se base sur la multiplication des essais. C'est encore plus vrai pour les protéines membranaires. On peut cependant dégager quelques grandes tendances, qui reposent davantage sur la transposition d'une protéine à l'autre que sur la rationalisation. Tout d'abord, la présence du précipitant va favoriser la séparation entre une phase pauvre en détergent et une phase enrichie. Celle-ci se présente sous forme d'une goutte unique ou de multiples gouttelettes dans lesquelles la concentration en protéine augmente, favorisant la nucléation. Ensuite, utiliser une concentration initiale faible de détergent permet d'abaisser la solubilité de la protéine, et d'éviter la formation de phases de tensio-actifs organisés.

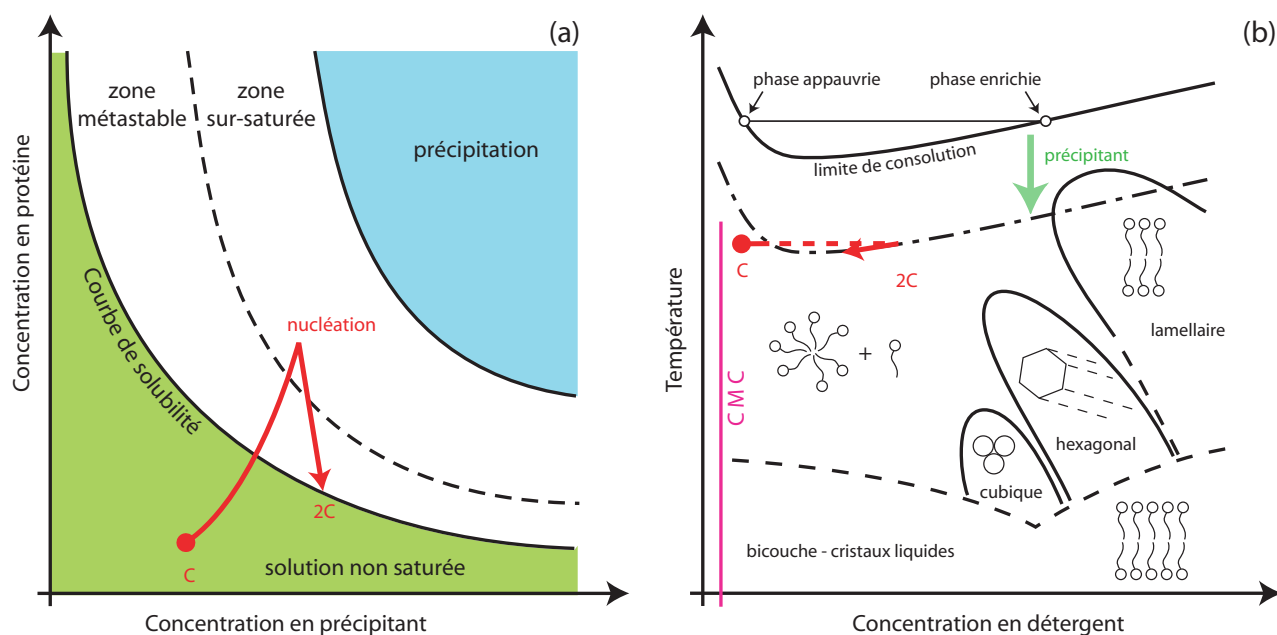


FIG. 4.1 – **Diagramme de phase et cristallisation.** (a) Diagramme de phase d'un système protéine-précipitant. (b) Diagramme de phase d'un détergent. Au-dessus de la limite de consolution apparaît une séparation de phase. La limite de consolution est abaissée en présence d'un précipitant. Les flèches rouges représentent le trajet suivi pendant une expérience réussie de cristallisation par diffusion de vapeur, dans le cas où intervient une séparation de phase.

4.3 Cristallisation en champ magnétique

Des travaux indiquent que la présence d'un champ magnétique peut exercer une influence sur la cristallisation, au moins dans le cas de protéines solubles modèles. Le nombre, la rapidité d'apparition ou encore l'orientation des cristaux peuvent être modifiés (voir Sato et al. [2000], Ataka et Wakayama [2002], Sato et al. [2007] et les références incluses). La mosaïcité⁹ peut diminuer sensiblement, alors que les autres paramètres cristallins sont marginalement affectés.

D'autre part, des membranes pourpres riches en bactériorhodopsine et des disques de membranes de cellules rétinales riches en rhodospine ont la capacité de s'orienter en présence d'un champ magnétique [Neugebauer et Blaurock, 1977, Chalazonitis et al., 1970, Saibil et al., 1976].

Grâce à Eric Beaugnon (CRETA) et James Torbet (IBPC), nous avons pu réaliser un essai de cristallisation de l'AAC dans des champs magnétiques horizontaux et verticaux. En présence d'un champ horizontal, on observe un net effet d'orientation des cristaux. C'est le seul effet visible puisque la qualité des données enregistrées à l'ESRF ne permet pas de connaître la mosaïcité, les facteurs de température, etc. . .

4.3.1 Principe et effet de l'action d'un champ magnétique

Un champ magnétique \vec{B}_0 peut exercer deux types d'actions sur un matériel biologique tel que le nôtre. Ces actions conduisent à un effet d'orientation et/ou à un effet de lévitation. L'orientation trouve sa source dans l'anisotropie de la susceptibilité magnétique de la particule considérée, et nécessite une assemblée organisée, par exemple un cristal, pour se manifester. L'effet de lévitation provient de la force magnétique répulsive liée à la susceptibilité.

La plupart des protéines possèdent une susceptibilité négative qui les range dans la catégorie des matériaux diamagnétiques. Le diamagnétisme est la forme la plus faible du magnétisme ; il se caractérise par un champ induit proportionnel au champ extérieur et qui s'oppose à lui. Cette susceptibilité est la traduction à l'échelle macroscopique des modifications des orbitales atomiques des électrons à cause du champ extérieur.

Les forces magnétiques ne seront pas développées ici. Disons simplement dans un gradient de champ vertical, et à condition que la différence de susceptibilité entre le milieu extérieur (une solution aqueuse) et la particule soit suffisamment forte, il peut y avoir une force générée qui annule la force de gravité. La norme de cette force s'écrit $F_m = 1/2 \cdot V(\chi_{part} - \chi_{milieu})\nabla H^2$ avec V le volume de la particule, et celle de la gravité $F_g = V(\rho_{part} - \rho_{milieu})g$.

Les forces magnétiques pourraient aussi avoir un effet sur la nucléation provenant d'une diminution de la convection et donc d'une zone de déplétion autour

⁹Des expériences de diffraction en capillaire montrent néanmoins que la mosaïcité d'un cristal de protéine provient essentiellement des manipulations et de la congélation. Il convient donc de rester prudent quant aux variations de celle-ci, qu'elles soient causées par un champ magnétique, par une micro-gravité, etc. . . (Richard Kahn, communication personnelle).

du cristal plus forte qu'en l'absence du champ

L'effet d'orientation provient de l'anisotropie de la susceptibilité magnétique causée par l'existence des structures secondaires, couplée à la présence d'un grand nombre de molécules dans une orientation identique.

4.3.2 Description de l'expérience

Cristallisation en goutte suspendue dans un champ magnétique vertical ou horizontal Une purification du complexe bAAC1-CATR Lapao a été d'abord cristallisée hors de l'aimant. Des cristaux poussent pendant la nuit, et la meilleure condition (35% Jeffamine M600, 100 mM Hepes pH 7,5 et 10 mM NiSO₄) est retenue après observation des gouttes. De nouveaux essais sont mis en place, dans la bobine créant un champ magnétique vertical de 16 T à différentes hauteurs, dans la bobine créant un champ horizontal de 7 T, et hors des bobines. Le champ magnétique horizontal est uniforme dans la zone où se trouvent les cristaux. Le champ magnétique vertical varie avec l'altitude. Les gouttes sont placées pendant 72 heures dans le champ magnétique, juste après mélange de la protéine et du précipitant. La température est maintenue constante à 20°C.

Résultats Des cristaux poussent dans l'ensemble des gouttes, dans les deux orientations de champ et dans l'expérience contrôle. L'observation au microscope des cristaux ne montre pas de différence frappante en terme de nombre, de forme et de taille des cristaux. On observe pas d'effet du champ vertical sur la localisation des cristaux dans la goutte.

Par contre, un net effet d'orientation des cristaux se manifeste en présence du champ magnétique horizontal (voir la figure 4.2). Au lieu d'être vus du « dessus », on les observe en effet depuis la « tranche ». Cet effet d'orientation est partiel, c'est-à-dire qu'il reste des cristaux non orientés. Il touche néanmoins une majorité de cristaux.

4.3.3 Autour de l'effet d'orientation

Les microgouttes suspendues constituent un système anisotrope La présence de tensio-actifs dans la goutte de cristallisation modifie la tension interfaciale, et par conséquent l'angle de contact du dioptré air-liquide avec la surface ainsi que la géométrie de la goutte. On observe un effet d'étalement : la dimension caractéristique de la goutte dans la direction verticale est plus petite que sa dimension dans le plan horizontal. La présence du champ de gravitation \vec{g} vertical crée également une anisotropie.

Nous observons les conséquences de cette anisotropie sur la croissance des cristaux. Les plaques sont majoritairement orientées avec leur petite direction parallèle à la verticale (voir le contrôle sur la figure 4.2). Si on conçoit facilement que l'orientation des cristaux puisse être anisotrope, je ne suis pas capable d'expliquer les causes de cette orientation. Interviennent peut-être le gradient de

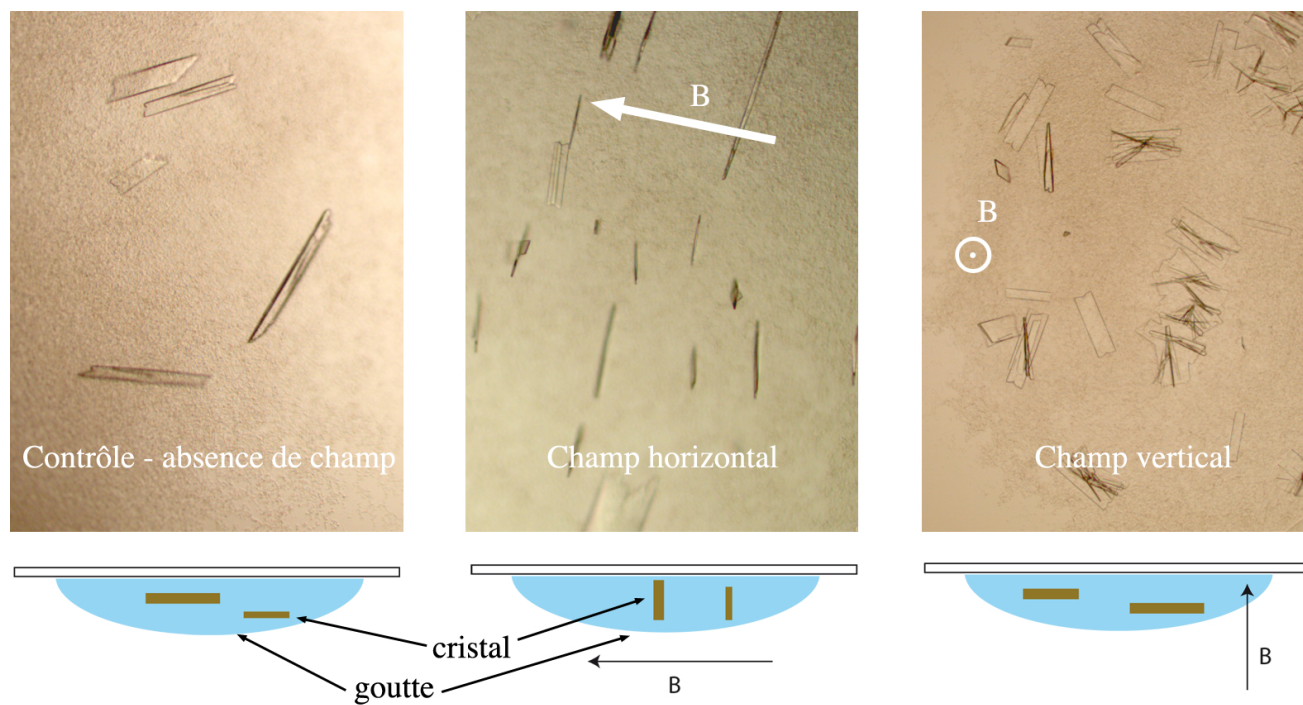


FIG. 4.2 – **Effet d'orientation des cristaux de bAAC1-CATR en présence d'un champ magnétique.** Photos et représentation schématiques de cristaux dans des gouttes soumises à un champ magnétique horizontal (au centre) ou vertical (à droite). On observe un effet d'orientation au centre. La taille caractéristique des cristaux est de $200 \times 50 \times 10 \text{ } \mu\text{m}$.

concentration –anisotrope lui aussi– en précipitant qui s’établit entre la surface et le fond de la goutte et les différences de mouvements de convection dans les trois directions. Je ne suis pas sûr que la gravité joue un rôle notable.

L’effet du champ magnétique domine l’anisotropie de la goutte Les cristaux observés dans cette expérience sont principalement des plaques. Le groupe d’espace correspondant est C222₁, et nous avons déjà décrit l’empilement cristallin (voir page 77). Sans en être sûrs, nous supposons que la petite direction correspond à la direction d’empilement des couches de molécules.

Par conséquent, la petite direction est *grossièrement* parallèle à l’axe des hélices transmembranaires. Il s’agit d’une vision simplifiée, puisque les hélices sont inclinées et coudées, elle reste néanmoins valable pour l’interprétation qualitative de l’effet du champ magnétique.

La capacité d’orientation d’une protéine dans un champ magnétique provient en premier lieu de l’anisotropie de susceptibilité magnétique de la liaison peptidique [Worcester, 1978]. En effet, la délocalisation des électrons π au niveau de la liaison N–C et C–O a pour conséquence que les cinq atomes qui la composent sont inclus dans un plan.

Par analogie avec la liaison ester, on peut estimer l’anisotropie molaire de susceptibilité magnétique de la liaison peptidique : $\Delta\chi_M = \chi_{//} - \chi_{\perp} = 8,8 \cdot 10^{-13} \text{ J.gauss}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ (à comparer à celle du benzène de $54 \cdot 10^{-6} \text{ J.gauss}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). Lorsque les polypeptides s’organisent en structures secondaires, les effets de l’anisotropie des différentes liaisons peptidiques peuvent avoir des contributions additives. Le cas d’une hélice α est le plus favorable car les liaisons sont orientées par rapport à l’axe de l’hélice et la contribution totale est de l’ordre de $1/2 \cdot n \cdot \Delta\chi$ pour une hélice de n résidus [Worcester, 1978].

A l’échelle d’une molécule, l’effet de l’anisotropie est néanmoins minuscule par rapport à l’agitation thermique et l’orientation est en conséquence très faible. En terme d’énergie, on a $E_m = |\Delta\chi|H^2 \ll kT \sim 4 \cdot 10^{-21} \text{ J}$.

Par contre dans le cas d’un grand nombre de molécules organisées, on observe une additivité de l’anisotropie qui peut conduire à une forte orientation. Les protéines membranaires en hélices α participant à des organisations supra-moléculaires sont donc particulièrement aptes, avec leurs segments transmembranaires perpendiculaires à la membrane, à s’orienter dans un champ magnétique. L’orientation de disques de membranes de cellules rétinales (riches en rhodopsine) a d’ailleurs été décrite il y a plus de trente ans [Chalazonitis et al., 1970].

On estime que l’énergie magnétique doit être supérieur à dix fois l’énergie thermique pour observer une forte orientation [Torbet, 1983]. Dès lors on peut donner la taille minimale du noyau cristallin susceptible de s’orienter. La structure bAAC1 dans la conformation inhibée par le CATR présente très grossièrement 6 hélices de 30 résidus inclinées d’une quinzaine de degrés par rapport à la normale à la membrane. L’énergie magnétique d’un noyau cristallin de N molécules s’écrit donc :

$$E_m = |N \cdot \frac{1/2 \cdot n \cdot \Delta\chi_M}{N_a} \cdot \text{facteur d'orientation}| \cdot H^2 \quad (4.1)$$

Soit dans un champ de 7 T :

$$E_m = |N \cdot 6 \cdot \frac{1/2 \cdot 30 \cdot 8,8 \cdot 10^{-6}}{6,02 \cdot 10^{23}} (3/2 \cos(15^\circ) - 0,5)| \cdot 70000^2 \simeq 1,06 N \cdot 10^{-24} \text{ J} \quad (4.2)$$

Il faut donc $N > 4 \cdot 10^4$ molécules pour observer une forte orientation¹⁰.

La modification de l'orientation des cristaux en présence d'un champ magnétique horizontal est donc en accord avec la théorie. Celle-ci explique également l'absence d'effet apparent du champ vertical : celui-ci renforce l'anisotropie naturelle de la goutte suspendue. Sans que je ne sois capable d'en proposer une quantification, il est intéressant de noter que l'effet magnétique est suffisamment fort pour l'emporter sur l'anisotropie du système.

Il faut noter ici que l'effet du champ sur la qualité des cristaux pose question. En effet, si les cristaux croissent en absorbant des monomères en solution, alors il n'est pas évident d'imaginer par quel mécanisme le champ magnétique pourrait contribuer à une meilleure organisation cristalline.

Des cristaux diffractants pour aller plus loin De nombreux cristaux ont été pêchés, congelés puis analysés à l'ESRF. Malheureusement, la qualité de diffraction des cristaux, contrôlée ou poussée en présence d'un champ magnétique, n'était pas suffisante pour permettre l'analyse des paramètres de diffraction.

Nous disposons à présent au laboratoire de cristaux d'autres protéines membranaires, qui permettent d'envisager une suite à cette première expérience. On peut imaginer observer le même effet d'orientation sur des cristaux en forme de plaques du photosystème de *Rhodobacter spheroides*, et surtout analyser l'effet du champ sur des cristaux de la protéine modèle AcrB de *E. coli*, dont la diffraction est suffisante et reproductible.

4.4 Détection par diffraction de cristaux en phase cubique de lipides

Cette section décrit des expériences réalisées pendant la première période de ma thèse. Elles sont restées en suspens depuis, pour diverses raisons dont ma préférence pour l'étude du transporteur n'est pas la moindre. J'inclus ici les résultats préliminaires obtenus.

¹⁰Notons toutefois qu'il s'agit d'une estimation basse dans laquelle l'effet des segments hélicoïdaux, et celui des résidus aromatiques orientés parallèlement à la membrane ne sont pas pris en compte (il vont diminuer la valeur de $\Delta\chi$). Un résidu aromatique contribue autant que treize liens peptidiques dans une hélice, et les segments hélicoïdaux comptent une trentaine de liaisons... l'anisotropie est diminuée d'autant, et donc N augmente. Retenons au final que le nombre de molécules nécessaire à une orientation est petit devant la population d'un cristal.

4.4.1 Phases cubiques de lipides et protéines membranaires

Landau et Rosenbusch ont initié en 1996 une nouvelle méthode de cristallisation des protéines membranaires [Landau et Rosenbusch, 1996], dite en phase cubique de lipides (Φ^3). La première structure obtenue grâce à cette méthode est celle de la bactériorhodospine, au laboratoire [Pebay-Peyroula et al., 1997].

Cette méthode repose sur la capacité de certains lipides à former des réseaux continus de bicouches incurvées. Une protéine membranaire peut s'incorporer et diffuser dans ces bicouches. Les phases cubiques forment donc une matrice favorable à double titre : 1. vis-à-vis de la stabilité des protéines membranaires de par la ressemblance à leur environnement natif ; 2. vis-à-vis de la cristallisation car les variations de courbure de la bicouche peuvent favoriser l'agrégation latérale des protéines.

Position du problème : les essais de cristallisation en phase cubique sont plus pénibles que les essais en diffusion de vapeur Le protocole de préparation des essais en phase cubique se déroule comme suit :

- le lipide en poudre est pesé et introduit dans le corps d'une seringue Hamilton modifiée,
- la solution protéique est placée dans un deuxième corps de seringue,
- une fois les seringues connectées, une centaine d'allers-retours des pistons permet la formation de la phase cubique intégrant la protéine par mélange mécanique,
- le gel obtenu est réparti dans des tubes en verre scellés et pesés individuellement deux fois (pour quantifier la phase cubique, puis le précipitant),
- les tubes sont observés au microscope.

L'épaisseur de la phase cubique, les dioptries courbes (les tubes sont cylindriques) rendent l'observation ardue. La pénibilité de l'ensemble de la manoeuvre fait des phases cubiques un bon test de la patience et de la pugnacité d'un thésard ou d'un postdoctorant.

Plus sérieusement, on peut dire que la technique de cristallisation en phase cubique relève encore, tant que les développements technologiques ne sont pas finalisés, de l'artisanat, alors que les essais en diffusion de vapeur ont énormément bénéficié de l'apport de la robotisation et de la miniaturisation.

Développements technologiques autour des phases cubiques Des avancées technologiques, qui ne se sont pas encore concrétisées par la commercialisation de matériel, sont rapportées dans la littérature. V. Cherezov a conçu un robot capable de « pipeter » les gels [Cherezov et al., 2004]. Des exemples de plaques de cristallisation adaptées [Cherezov et al., 2004] sont décrites. L'originalité de notre approche tient à la méthode de détection : les autres plaques utilisent des supports en verre pour clore les puits, non transparentes aux rayons X et donc impropres à la détection des cristaux par diffraction.

La possibilité de détection directe des cristaux par diffraction Il est possible de détecter sans observation préalable des cristaux de protéine dans une goutte à l'aide d'un faisceau de rayon X [Jacquamet et al., 2004]. S'il ne faut pas interpréter cette possibilité en annonçant l'avènement de l'automatisation totale de la résolution de structure, elle reste néanmoins attrayante, par exemple pour faire la différence entre un cristal de sel et un cristal protéique¹¹. Dans le cas particulier des phases cubiques, avec les grandes difficultés d'observation connues, une plaque conciliant observation optique et détection par diffraction paraît un *proof of concept* intéressant.

A plus longue échéance, au vu des difficultés pour extraire, récupérer, laver, monter sur une boucle un cristal issu d'un essai en phase cubique, l'idée, aujourd'hui chimérique, de collecter les données de diffraction *in situ* est très attirante.

4.4.2 Notions de base concernant les phases cubiques

Qu'est-ce qu'une phase cubique ? En présence d'eau, les lipides, comme les autres molécules amphiphiles, peuvent se structurer en différentes phases. La phase lamellaire où les lipides s'organisent en bicouches est connue depuis longtemps des biologistes, mais d'autres types de phases existent pour certains lipides : structures hexagonales, structures cubiques... (figure 4.3). Ce sont à ces dernières, et plus précisément aux **phases cubiques bicontinues** que nous nous intéressons. Celles-ci sont caractérisées par un ordre tridimensionnel à grande échelle : les molécules de lipides s'agencent en bicouches courbées selon un motif qui se répète « comme dans un cristal », cristal dont les mésophases se distinguent par le désordre local, des chaînes carbonées notamment. Ces phases sont transparentes et visqueuses : d'aspect elles ressemblent à un gel. Elles sont isotropes, ce qui permet de les caractériser avec un microscope polarisant par opposition aux phases lamellaires anisotropes. Elles peuvent être métastables et on peut observer la persistance pendant plusieurs semaines de Φ^3 chauffées ou refroidies par rapport à leur température usuelle de formation.

Les Φ^3 sont classées en fonction de leur groupe d'espace caractérisé par diffraction des rayons X et cryo-microscopie électronique, et portent des noms qui indiquent les symétries qu'elles présentent. Seul un petit nombre de groupes d'espace différents ont été mis en évidence : Ia3d, Pn3m, Pm3n, Im3m... sans doute existe-t-il des Φ^3 avec d'autres groupes d'espaces qui n'ont pas encore été caractérisées. La description la plus répandue de ces Φ^3 , issue de la géométrie différentielle, repose sur les surfaces minimales périodiques¹² (IPMS, acronyme de *Infinite Periodic Minimal Surfaces*), qui ont comme propriété d'avoir une courbure moyenne nulle. Cela signifie sommairement qu'en tout point, si la surface est concave dans une direction, elle sera convexe dans la direction perpendiculaire du plan tangent. Un exemple typique de point avec une courbure moyenne

¹¹ C'est aussi possible avec un robot imageur « classique » capable de travailler dans le visible et à 280 nm, comme celui que développe G. Schertler.

¹² voir le site www.msri.org/publications/sgp/jim/geom/level/library/triper/index.html mis à jour par J. Hoffmann.

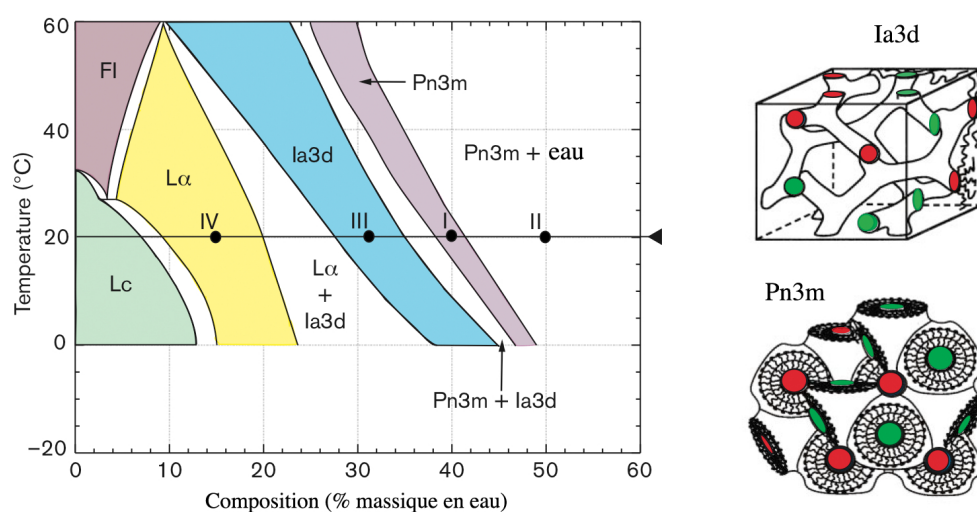


FIG. 4.3 – **Mésophases lipidiques.** A gauche le diagramme de phase métastable du système eau-monooléine. L_C phase lamellaire cristalline; Ia3d et Pn3m phases cubiques; FI phase fluide isotrope; L_α phase lamellaire cristalline liquide. A droite la représentation schématique des phases cubiques Ia3d et Pn3m; la présence d'eau est indiquée par la couleur.

nulle est le centre d'une surface en selle de cheval.

Les Φ^3 sont caractérisées à la fois par un type de réseau, mais également par un paramètre de maille. Au sein d'un même réseau on peut observer des variations du paramètre de maille de l'ordre de 30%. Le groupe d'espace, le paramètre de maille et leurs variations (fonction de la composition du mélange lipides-eau, de la température, d'éventuels additifs...) sont fondamentaux pour les essais de cristallisation.

Mécanisme de la cristallisation On ne connaît pas bien le mécanisme qui gouverne l'apparition puis la croissance de cristaux en Φ^3 ; néanmoins, la littérature [Nollert et al., 2001] en décrit le canevas, dans lequel la **correspondance imparfaite** entre les parties hydrophobes de la protéine et celles de la bicouche de lipides —qui dépend du paramètre de maille de la phase cubique— serait à l'origine de l'organisation latérale des protéines au sein d'une phase lamellaire en cristaux 2D, puis en cristaux 3D par empilement de couches lamellaires. Celles-ci ont été imagées par microscopie à force atomique [Qutub et al., 2004].

L'idée générale est donc la suivante : les protéines sont incorporées de manière homogène au sein de la Φ^3 (cela se vérifie par l'homogénéité de la couleur pourpre d'une préparation de bR en Φ^3); la courbure de la bicouche est faible et la partie hydrophobe de la protéine est bien protégée par les chaînes acyles des lipides. Une perturbation du paramètre de maille induite par l'ajout d'agent(s) précipitant(s) augmente la courbure de la bicouche. La correspondance entre les zones hydrophobes protéiques et lipidiques est moins bonne, les protéines diffusent vers des zones locales où les lipides sont organisés en lamelles (autour des cristaux, on peut mettre en évidence des régions biréfringentes — donc non cubiques — que l'on suppose lamellaires). Des contacts protéine-protéine, favorisés par l'ajout des précipitants, se forment et un arrangement cristallin 2D puis 3D prend naissance (figure 4.4).

Des travaux méthodologiques ont exploré l'influence de différents précipitants [Cherezov et al., 2001], de différents détergents [Misquitta et Caffrey, 2003], de différents lipides [Misquitta et al., 2004], tout comme la possibilité d'utiliser les phases éponges (ou plutôt les phases cubiques fondues) [Cherezov et al., 2006b] sur la cristallisation.

4.4.3 Un prototype de plaque pour la détection directe par diffraction

Préparation des échantillons La mono-oléine est commandée chez Nu-Check. Le lyzosome est mis en solution à partir d'une poudre lyophilysée commerciale (Roche). La bactériorhodospine est préparée à partir de membrane pourpre [Gordeliy et al., 2003] fournie par V. Gordeliy (IBIS-2, Jülich), ou utilisée directement dans le cas de la protéine purifiée (fournie par V. Gordeliy ou Y. Gohon de l'IBPC). Les phases cubiques sont formées par mélange mécanique à partir de 60% de lipides et 40% de solution protéique en rapport poids-volume. Le lysozyme est concentré à 30 mg/mL dans un tampon d'acétate de sodium

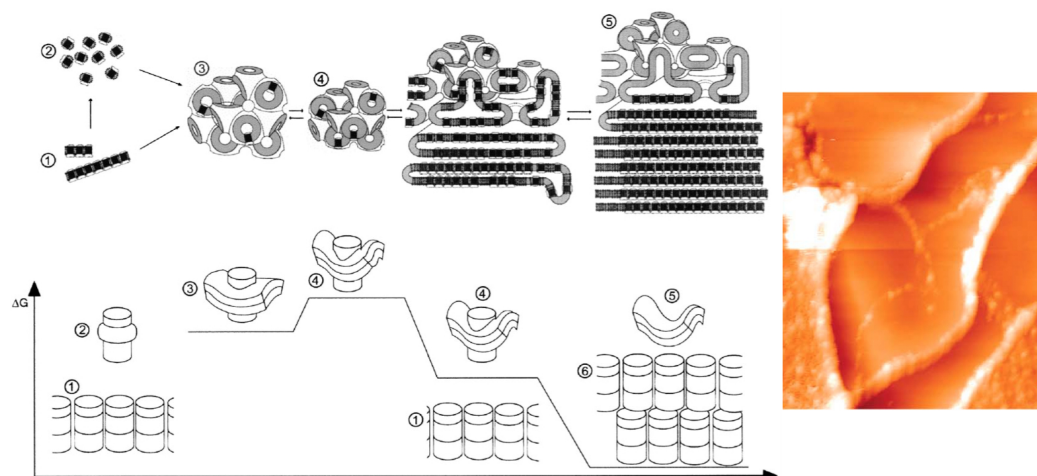


FIG. 4.4 – **Mécanisme de cristallisation en phase cubique.** En haut, description schématique des étapes de la cristallisation de la bR en Φ^3 . Des *patches* de membranes (1) ou des complexes protéine-détergent (2) de bR sont intégrés spontanément dans la Φ^3 , et peuvent y diffuser librement (3). L'ajout de sels augmente la courbure de la bicouche de lipides et diminue la taille de la maille (4). L'extraction de la protéine hors de la bicouche courbée et son incorporation dans des domaines lamellaires favorise la nucléation. Cette extraction est favorisée énergétiquement par la mauvaise correspondance entre les parties hydrophobes des lipides et de la protéine dans la Φ^3 . Le processus de cristallisation est achevé lorsqu'un cristal coexiste avec une Φ^3 pauvre en bR (5). Une structure lipidique permet la diffusion des protéines depuis et vers le cristal : la réhydratation entraîne la dissolution du cristal et la protéine revient alors dans la phase cubique. En bas, représentation schématique des interactions protéines-membrane au cours de la cristallisation, et des changements d'énergie libre correspondants. Repris de Nollert et al. [2001]. L'image à droite est un cristal de bR vu par AFM, où l'on voit l'empilement des couches cristallines [Qutub et al., 2004].

pH 4,6, et la bactériorhodopsine est concentrée à 5 mg/mL dans 370 mM de tampon phosphate à pH 5,6 contenant 1,2% (m/v) β -OG. Le précipitant est ajouté sous forme de solution saline concentrée manuellement ou avec le robot Cartésien de l'EMBL pour atteindre une concentration finale de l'ordre de 1 M.

Description de la plaque Le prototype est formé de trois plaques percées d'un même motif de trous (figure 4.5). Les échantillons sont déposés dans les trous de la plaque interne, et l'étanchéité est assurée par deux films de polymères huilés. La contenance des trous est de l'ordre de 2 mg de phase cubique. Les dimensions extérieures de la plaque sont identiques à celles d'une plaque 96 standard, ce qui permet la compatibilité avec les robots existants.

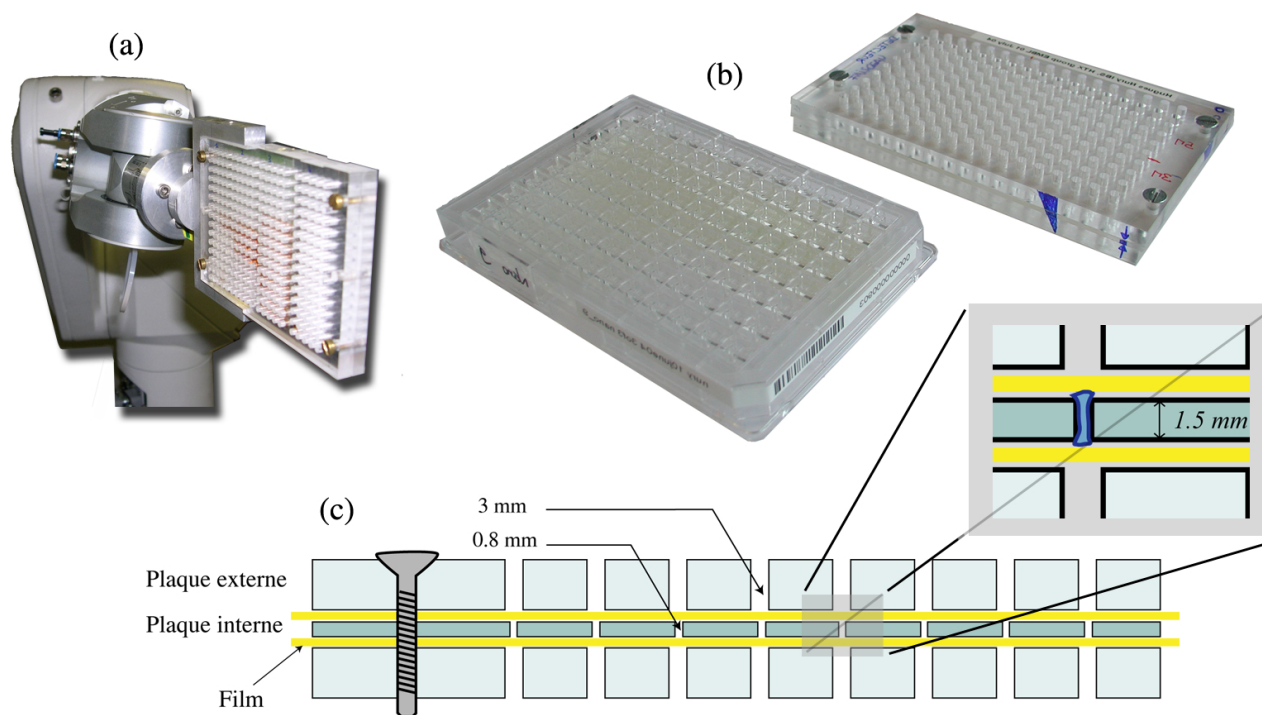


FIG. 4.5 – **Le prototype de plaque de cristallisation.** (a) Photographie de la plaque maintenue par la pince du robot de la ligne de lumière FIP. (b) Photographie d'une plaque Greiner et de notre prototype côte-à-côte. (c) Schéma en coupe de la plaque, la phase cubique est représentée en bleu sur l'encart de droite.

Tests de diffraction Ceux-ci sont réalisés sur la ligne de lumière FIP (BM30A) de l'ESRF, avec l'aide de Jérémy Ohana, et grâce au dispositif mis en place par

Jean-Luc Ferrer et Lilian Jacquamet. La plaque est placée sur une pince spéciale du robot de manipulation, qui vient la disposer devant le faisceau. Après un centrage parfois homérique, nous pouvons enregistrer plus de seize images par puits pour scanner entièrement son contenu, avec des oscillations de notre choix (en général de 10°). La taille du faisceau influe peu sur la détection des cristaux (intervalle testé de 50 à 500 μm).

Il faut comprendre que lors de ces tests à l'ESRF, nous travaillons en aveugle, c'est-à-dire que nous ne savons pas si l'image de diffraction que nous enregistrons correspond à une zone où se trouve un cristal. Lorsqu'on utilise des cristaux montés dans des boucles en nylon, une caméra permet de centrer le cristal dans le faisceau de rayons X. Dans le cas de la plaque, et avant la reconstruction de la ligne FIP, la visualisation optique ne permettait pas de regarder les puits. Ce devrait dorénavant être possible puisque la nouvelle caméra est « dans l'axe », c'est-à-dire qu'elle permet de voir les cristaux dans la direction d'arrivée des rayons X.

4.4.4 Résultats

Croissance et observation des cristaux Nous avons réussi à faire pousser des cristaux de lysozyme en phase cubique dans les puits de notre plaque, par contre nous ne sommes pas parvenus à obtenir de cristaux de bactériorhodopsine à l'intérieur des puits (figure 4.6.b et .c). Il s'agit probablement d'un problème de scellement des puits par le film, qui permet à la phase cubique de s'étaler sur le pourtour. Il est étonnant de constater que des cristaux apparaissent sur ce pourtour mais pas dans le puits, comme si la phase cubique y était différente (peut-être car compressée mécaniquement lorsqu'on appuie sur le film ?).

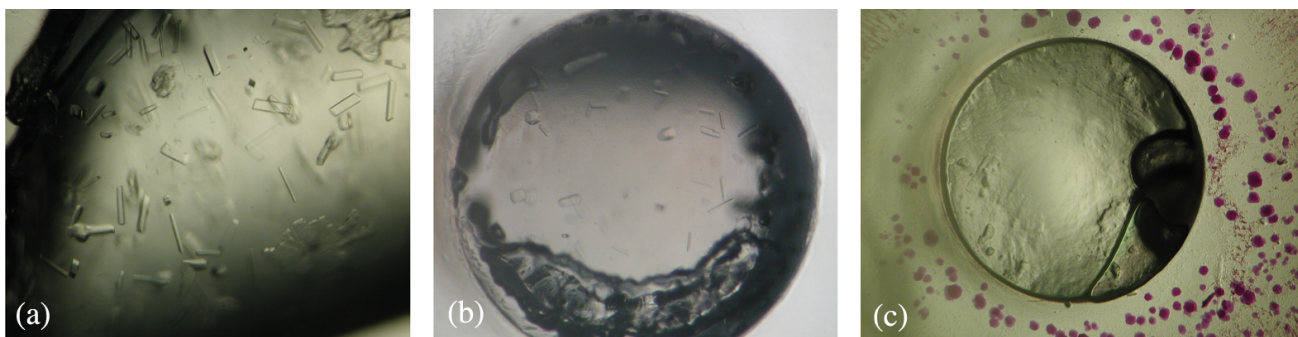


FIG. 4.6 – **Cristaux dans la plaque pour les phases cubiques.** (a) Cristaux de lysozyme en phase cubique dans un tube. (b) Cristaux de lysozyme poussés dans la plaque. (c) Cristaux de bR sur le pourtour d'un puits de la plaque.

L'observation des cristaux par microscopie optique est excellente, comme le

montrent les photos de la figure 4.6. Toutefois, l'observation en lumière polarisée n'est plus possible puisque les films qui ferment les puits sont des polymères étirés et donc anisotropes.

La qualité du scellement est meilleure avec du film Sarant (du film transparent de cuisine) qu'avec du kapton ou du mylar, utilisés initialement pour leur transparence aux rayons X. Lors de l'emploi de Sarant sur une plaque huilée, on ne voit pas de déshydratation au bout de plusieurs semaines. Cette déshydratation intervient en quelques jours avec les autres films dans les conditions testées.

Quelques taches de diffraction... Nous détectons correctement les cristaux de lysozyme présents dans la phase cubique (figure 4.7.b). Il n'en est pas de même pour les cristaux de bactériorhodopsine, qu'ils soient transférés depuis un tube (figure 4.7.c) ou qu'on essaie de voir ceux ayant poussé sur le pourtour d'un puits (figure 4.7 d à f).

Amélioration des résultats Ces expériences de détection directe de la diffraction de cristaux en phase cubique seront poursuivies, et les efforts devront porter conjointement sur la croissance de cristaux de bR directement dans les puits de la plaque, et dans le bon contrôle de la position du faisceau et des paramètres géométriques lors du test de diffraction.

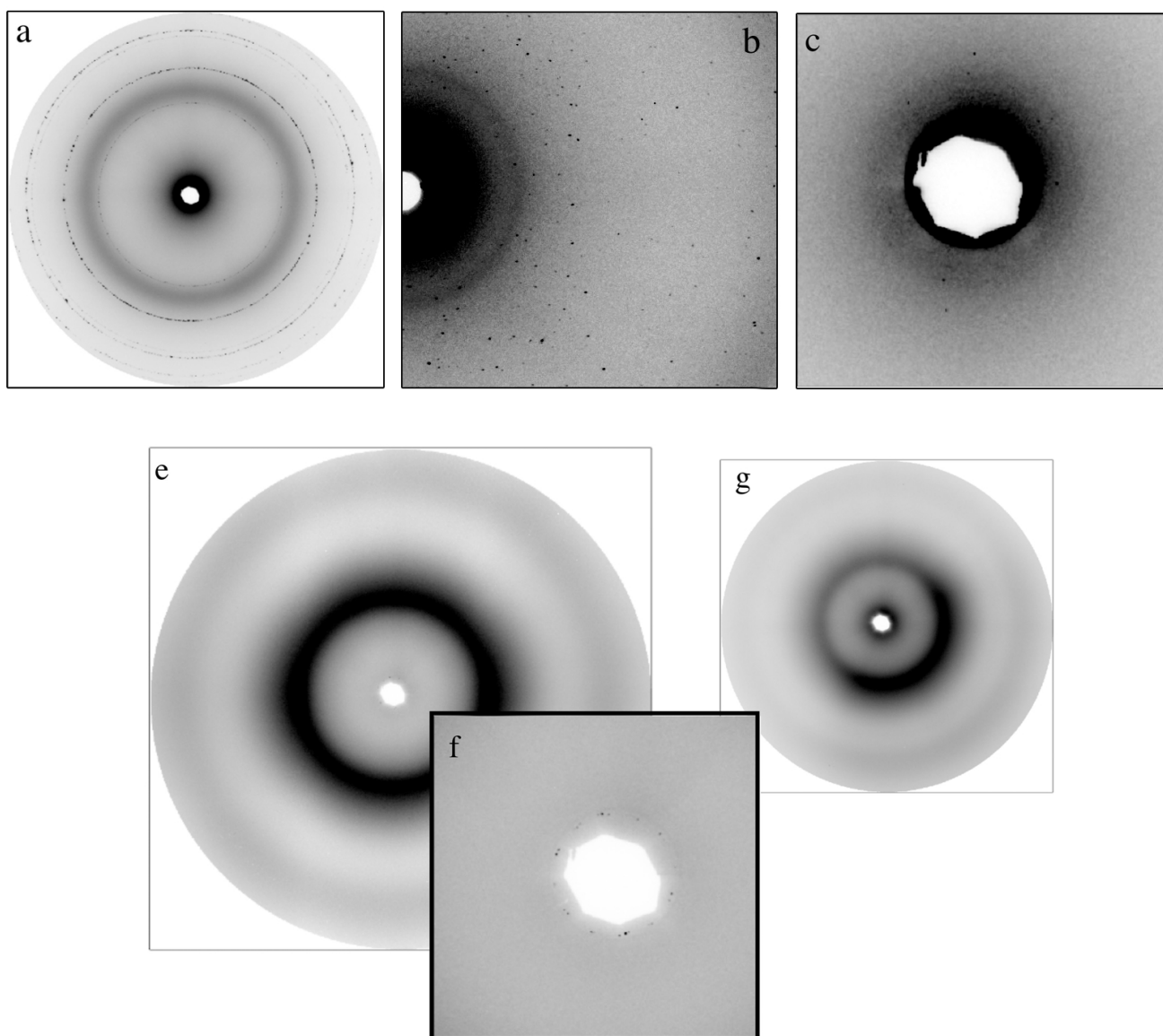


FIG. 4.7 – **Diffraction des cristaux dans la plaque.** (a) Diffraction du sel utilisé comme précipitant. (b) Diffraction de multiples cristaux de lysozyme (basse résolution). (c) Quelques taches attribuées à des cristaux de bR transférés depuis un tube. (e) Sur le pourtour d'un puits, là où l'épaisseur de plastique est maximum (anneaux de diffusion). (f) Grossissement du centre de l'image. On voit des taches caractéristiques des lipides (g) Lorsqu'on commence à toucher le bord du puits, une forte diffusion apparaît.

Chapitre 5

Conclusions et perspectives

5.1 Conclusions

Nous avons obtenu une nouvelle forme cristalline du complexe bAAC1-CATR, à faible force ionique. Ces cristaux ont permis une meilleure description des trois cardiolipides associés à la protéine. Les têtes polaires de ceux-ci interagissent avec des résidus conservés et reliés par la pseudo-symétrie d'ordre trois. L'empilement cristallin de cette nouvelle forme met en évidence des monomères accolés, avec une double couche de cardiolipides séparant les protéines au niveau des interfaces.

L'ultracentrifugation analytique d'échantillons semblables à ceux destinés à la cristallisation nous a permis de montrer que la protéine est monomérique dans les dernières étapes de sa purification. La diffusion des neutrons conduite sur les mêmes échantillons donne des résultats d'interprétation délicate, à cause de l'incertitude qui entâche la détermination du point d'annulation du contraste. Ces résultats remettent en cause l'interprétation par un modèle dimérique des données équivalentes de la littérature.

Nous nous sommes heurtés à l'impossibilité de copurifier l'AAC avec deux de ses partenaires potentiels. Ni la cyclophiline D, ni Vpr, dans les conditions testées, n'interagissent fortement avec le transporteur. La recherche de la structure d'une autre conformation de l'AAC est un problème difficile, que nous avons choisi d'aborder par le biais des interactions protéine-protéine. Nos expériences montrent que cette piste n'est pas la bonne. Par ailleurs, elles forment un socle sur lequel pourrait s'appuyer une remise en question de la force des interactions entre protéines au sein du pore de transition de perméabilité, voire du rôle qu'y joue l'AAC.

Des résultats préliminaires encourageants de cristallisation après gradient de saccharose, de manipulation de la protéine à l'aide d'amphipols sont autant d'invitations à poursuivre le travail structural sur l'AAC. On peut en effet trouver des pistes cristallines nouvelles après élimination du détergent en excès, et les

amphipols pourraient permettre de réaliser un échange du détergent de solubilisation.

La cristallisation de l'AAC en présence d'un champ magnétique permet de mettre en évidence un effet d'orientation des cristaux. D'un point de vue méthodologique, c'est une observation intéressante qu'il faudrait corrélérer à une analyse de la qualité de la diffraction.

5.2 Perspectives

L'étude du transporteur mitochondrial d'ADP et d'ATP est un « vieux » sujet, pour lequel beaucoup de voies ont déjà été explorées, et de nombreuses données accumulées. Néanmoins, les perspectives de prolongement et d'extension d'un travail structural sur cette protéine sont riches. Si je disposais de quelques années, voici quelles envies je réaliserais :

1. Etudier l'effet sur la cristallisation de l'ajout de lipides Une telle étude pourrait commencer par des ajouts de cardiolipides lors d'une préparation usuelle, et en parallèle, après migration de la protéine dans un gradient de saccharose. Je crois qu'il ne faut plus attendre de disposer d'un moyen de contrôler l'environnement du complexe membranaire, bien qu'évidemment il soit plus pertinent d'ajouter des lipides à une protéine en liant peu, qu'à une protéine déjà accompagnée de 170 moles de lipides. Dans le cas idéal, il faudrait coupler ces expériences à des essais fonctionnels d'électrophysiologie, dorénavant envisageables au laboratoire¹.

2. Explorer l'échange de détergent à l'aide d'amphipols et 3. S'attarder sur la purification en présence de nucléotides modifiés Concevoir une chromatographie d'affinité pour l'AAC n'est pas une tâche facile, mais je crois que les implications possibles méritent de s'y atteler. Les compétences requises pour la mener à bien relèvent de la biochimie et de la chimie de synthèse.

4. Elargir le travail sur les partenaires protéiques Malgré mon expérience malheureuse dans l'étude des interactions protéiques, je pense que le laboratoire dispose à portée de main des compétences et du matériel pour explorer les interactions entre l'AAC, VDAC, PBR, la cyclophiline D... et que cette exploration peut porter ses fruits. Si des résultats positifs ne sont pas certains, un travail systématique pourrait permettre, le cas échéant, de rectifier une vision du PTP non conforme à la réalité.

5. Etudier la localisation du transporteur d'ADP/ATP L'étude de l'organisation des protéines dans leurs membranes natives avec la microscopie à

¹De tels essais sont possibles en *black lipid membrane* et non en *patch clamp*. On pourrait aussi considérer d'autres membres de la MCF pour lesquels on dispose d'un test fonctionnel.

force atomique, comme cela a été fait tout récemment pour VDAC, serait une méthode de choix pour trancher le débat sur l'oligomérisation du transporteur ADP-ATP. Grâce aux progrès de l'imagerie par fluorescence, on peut également imaginer à moyen terme pouvoir suivre la localisation et la dynamique des associations de protéines à l'échelle d'un organite tel que la mitochondrie. Ces approches expérimentales pourraient être couplées à une modélisation de la diffusion des molécules le long de la membrane interne à l'échelle mésoscopique.

Au niveau méthodologique Une expérience supplémentaire de cristallisation en champ magnétique avec les différentes protéines membranaires disponibles au laboratoire devrait permettre de recueillir des données sur la qualité de diffraction des cristaux. En ce qui concerne le prototype de plaque de cristallisation pour les phases cubiques, je pense qu'il est raisonnable de se limiter à valoriser les premiers résultats obtenus.

5.3 Hypothèses sur le mécanisme de transport

Une ébauche d'un mécanisme de transport ne peut être ni complète ni précise à l'échelle moléculaire : les informations structurales sont trop partielles. Par exemple, on ignore l'emplacement des sites de liaison des nucléotides et les mouvements lors des changements de conformation sont presque inconnus.

Cependant, certaines étapes de ces changements sont partiellement jalonnées. A partir de la structure, on peut en effet supposer que :

- l'ADP va être attiré puis descendre au fond de la cavité,
car il est difficile d'imaginer que la conformation non inhibée par le CATR ne comporte pas une cavité ressemblant à celle de la structure connue ;
- des ponts salins entre résidus chargés de la signature MCF vont se rompre,
car autrement on ne dispose pas de l'espace suffisant pour le passage du substrat ;
- ce qui permettra une modification de l'angle du coude des hélices et le pivotement des parties situées après les résidus proline,
la justification est identique à celle du point précédent ;
- les boucles matricielles vont subir des mouvements importants.
ce dernier point est appuyé par la biochimie, mais également par le fait qu'il faut laisser passer le substrat et dévoiler un site de fixation du nucléotide côté matriciel.

Aucun des quatre points précédents ne fait l'objet d'une certitude. Néanmoins il s'agit de suppositions plausibles, comme le soulignent les arguments en couleur.

La donnée conjointe de ces jalons, de la connaissance de la surface de la cavité, et de l'emplacement des lipides peut conduire à l'hypothèse partielle que nous allons maintenant développer.

Une asymétrie autour de CDL801 Le cardiolipide CDL801 est de loin le mieux défini dans les cartes de densité électronique². De plus ses conformations dans les formes cristallines centrées et primitives se ressemblent plus que celles des CDL800 et CDL802. L'empilement cristallin joue ici un rôle : on constate que les cardiolipides CDL801 adjacents des monomères A et B s'emboîtent, et de plus ces protéines sont proches, ce qui participe sans doute à une « prise en sandwich » efficace³. Est-il possible que ce meilleur positionnement reflète aussi une importance particulière du CDL801 ? Les interactions protéine-lipides ne semblent pas le dire : les trois lipides ont des interactions globalement équivalentes avec la protéine⁴, et le CDL801 n'est pas mieux fixé que les deux autres.

Néanmoins, il est tentant de pousser plus avant l'interprétation de cette asymétrie entre les cardiolipides. D'autant plus que des indications supplémentaires renforcent l'idée qu'il se passe peut-être des choses importantes dans la région proche du CDL801.

Eléments supplémentaires d'asymétrie

1. Observons d'abord l'intérieur de la cavité, dont la partie intéressante est reproduite figure 5.1. L'échelle verticale formée par trois résidus tyrosine se place dans une zone angulaire étroite, légèrement décalée par rapport au groupement phosphate P_B du CDL801. Cette échelle est prolongée dans sa partie basse par deux résidus hydrophobes exposés, I183 et G182, puis par deux résidus aromatiques, Y228 et F230 qui entourent la proline P229 (celle qui coude **H5**). Les résidus I183 et G182 ont été proposés comme appartenant au site de fixation de l'ADP [Robinson et Kunji, 2006]. Si le trajet de descente de la partie phosphate de l'ADP dans la cavité est délicat à décrire –car les régions positives sont réparties de manière hétérogène–, il est à l'inverse frappant de noter que les résidus susceptibles d'interagir avec la base adénine sont plutôt groupés dans une même zone angulaire.
2. L'asymétrie de fixation du CATR dans la cavité le place dans cette même zone (figure 5.2.c). Le noyau diterpène de la molécule est proche de l'hélice **H5**, et un des groupements carboxyles interagit avec R234 et R235. De même lors d'essais de docking de l'ADP à l'intérieur de la cavité, le nucléotide se positionne avec sa base orientée vers cette zone (figure 5.2.b).
3. La signature des transporteurs d'ADP et d'ATP, RRRMMM, se situe dans cette même zone (figure 5.2.d). Il existe un réseau de ponts salins entre R236, E264 et K271⁵.
4. La boucle **M1** comprend la cystéine 56 dont l'accessibilité varie lors des changements conformationnels [Hashimoto et al., 1999]. Cette boucle contient l'hélice **h₁₋₂** qui interagit avec l'autre groupement phosphate P1 du CDL801. Il est proposé que les mouvements de cette boucle aient une amplitude importante ; de plus il est également proposé que l'hélice **H2** subisse une

² revoir la figure 2.25 de la page 88.

³ revoir la figure 2.22 de la page 81, panneau en bas à gauche.

⁴ revoir la figure 2.27 de la page 90, panneau en haut à gauche.

⁵ revoir la figure 2.28 de la page 91, panneau de droite

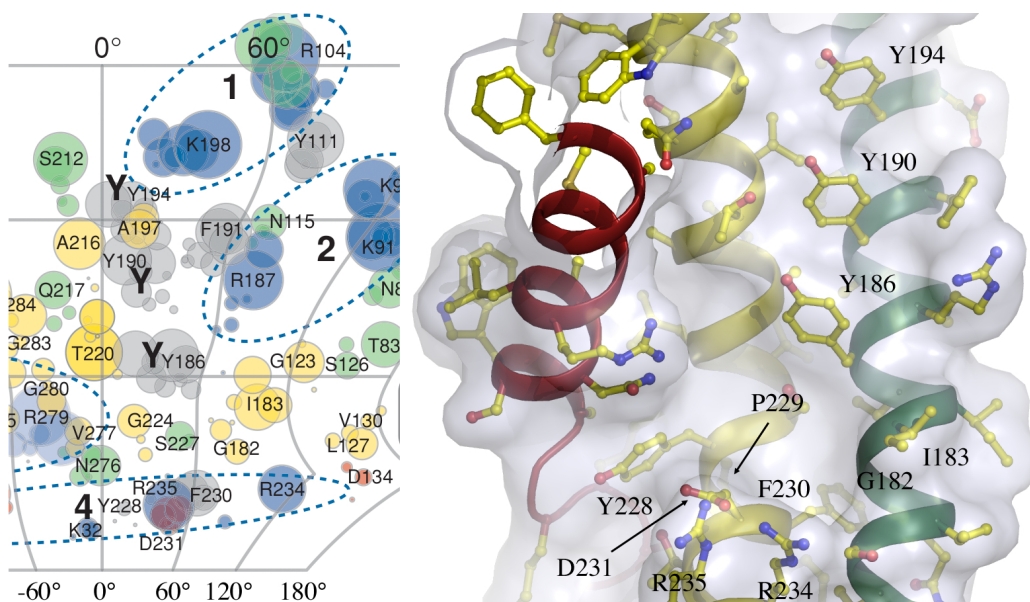


FIG. 5.1 – L'intérieur de la cavité près de P229 : la zone de descente de l'adénine ? A gauche une représentation plane des résidus exposés de l'intérieur de la cavité. A chaque atome correspond un cercle dont le rayon est proportionnel à l'exposition. A droite les résidus de cette même zone de la cavité dans le modèle atomique. Le phosphate P_B (non représenté) serait « à gauche » de cette zone (à titre indicatif : $\theta_{P229} = 152^\circ$ et $\theta_{P_B} = 225^\circ$).

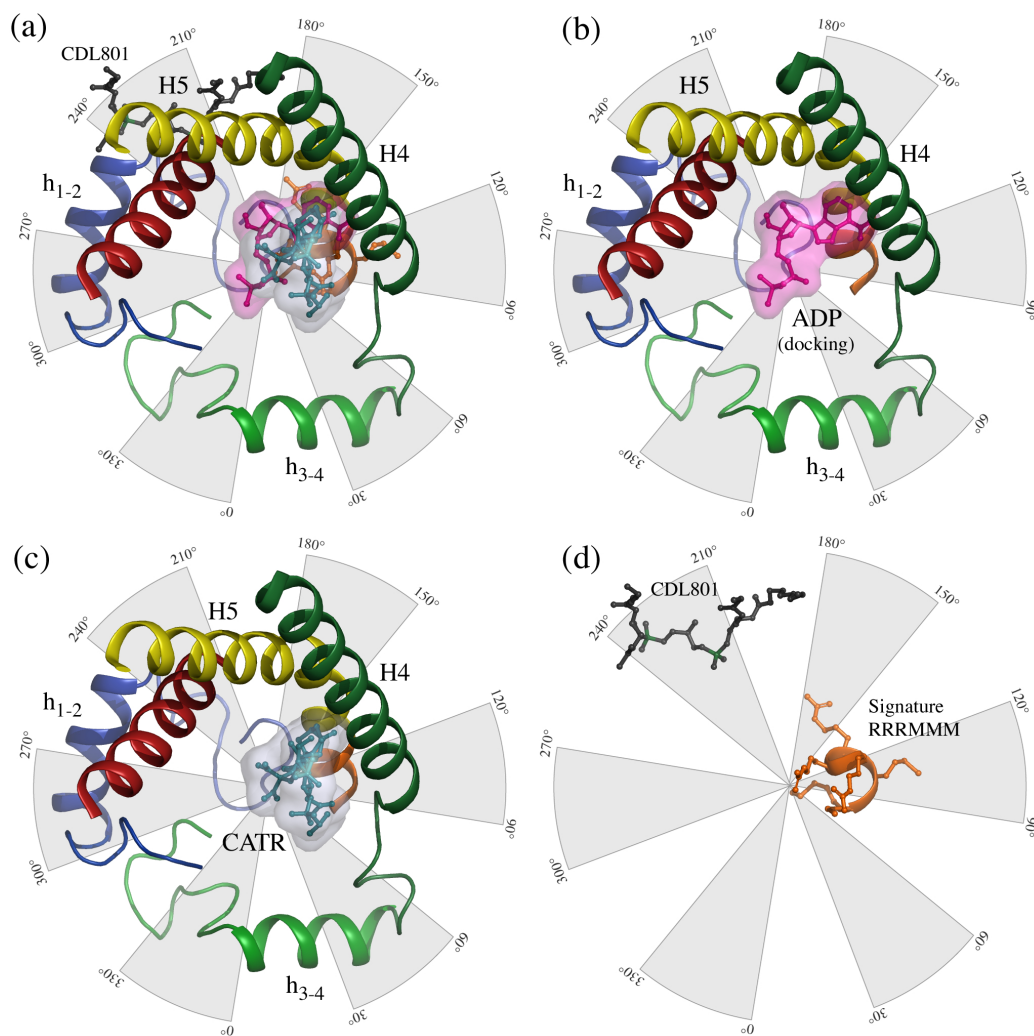


FIG. 5.2 – **Autres éléments d'asymétrie.** Position angulaire, dans une vue depuis l'espace intermembranaire, des éléments impliqués dans le mécanisme de transport. (a) Les hélices **H4** (échelle de tyrosines) **H5** (comprenant P229) et **H6** (reliée au cardiolipide 801), le CDL801, les boucles matricielles **M1** et **M2**, le CATR et un ADP (essai de docking). Comme il devient difficile de voir la place de chacun des éléments, les panneaux suivants les reprennent un par un. (b) Position de l'ADP (essais de docking). (c) Position du CATR. (d) Position du CDL801 et de la signature RRRMMM.

modification de sa conformation lors du transport via des expériences de scanning cystéine [Kihira et al., 2004]. Le groupe des hélices **H1** et **H2** est, à la hauteur des prolines conservées, diamétralement opposé à la zone angulaire décrite ci-dessus.

Je propose donc un mécanisme de transport asymétrique dans lequel la zone angulaire autour de P229, F270 et de P_B du CDL801 est relativement contrainte, tandis qu'à l'inverse de plus amples mouvements auraient lieu « de l'autre côté » de la protéine, au niveau de la boucle **M1** et de l'hélice **H1**.

Voyons comment un tel scénario peut se dérouler, et le rôle qu'y joue le cardiolipide CDL801.

Ce n'est pas le rôle du CDL801 d'accomoder un « mismatch » hydrophobe Le rôle de protection des surfaces hydrophobes des protéines joué par les lipides est connu ; les lipides structuraux peuvent ainsi permettre une adaptation locale de l'épaisseur de la bicouche à l'épaisseur de la couronne hydrophobe sur le pourtour de la protéine. Le prolongement de ce raisonnement peut conduire dans notre cas à imaginer que les cardiolipides accompagnent les changements de conformations, si ceux-ci font « dépasser » une plus large zone hydrophobe du côté matriciel. Je ne pense pas que cette hypothèse soit bonne.

Il est très plausible que l'exposition à la matrice soit plus importante au cours du cycle de transport qu'elle ne l'est dans la structure connue. C'est le corollaire du mouvement des boucles, de la modification éventuelle du coude des hélices paires. Et cela a été observé indirectement dès 1980 à travers les expériences de microscopie après cryofracture [Brandolin et al., 1980] dans lesquelles la répartition des protéines entre les couches concave et convexe après fracture est différente en fonction de l'inhibiteur, ce qui est un indice d'un changement d'exposition en conformation BA.

Néanmoins si des lipides accompagnent ce mouvement, ce ne sont probablement pas les cardiolipides structuraux. En effet, l'analyse de l'hydrophobie des faces du segment hélical **h₁₋₂** montre que la face orientée vers l'extérieur est relativement hydrophobe (figure 5.3). Or cette face n'est pas protégée par un des cardiolipides visibles dans la carte de densité. De plus les chaînes aliphatiques qui partent du phosphate P_A (le plus proche de **h₁₋₂**) n'interagissent pas avec la protéine, et devraient interagir plutôt avec des lipides protégeant **h₁₋₂**. Ceux-ci, formant une sorte de seconde couche, pourraient accompagner le mouvement de la boucle **M1** si nécessaire (comme grossièrement schématisé figure 5.4).

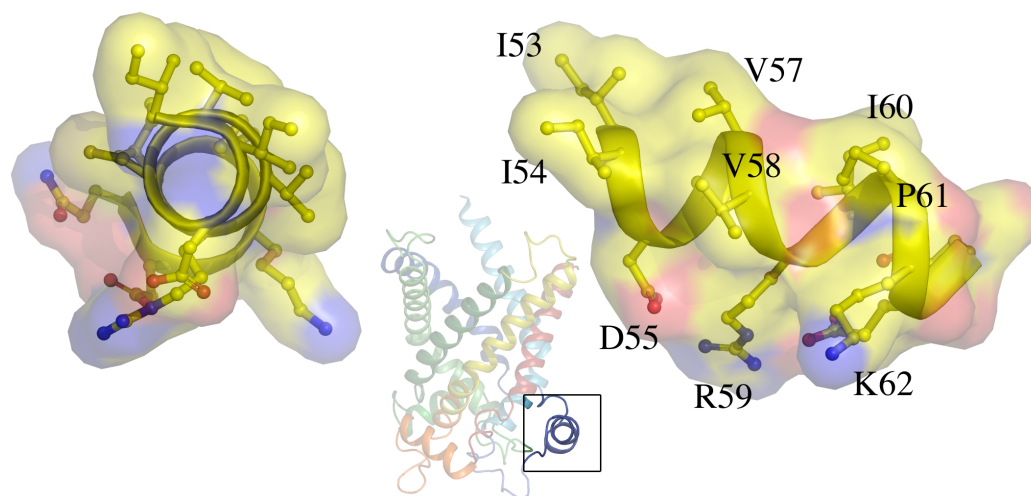


FIG. 5.3 – **Surface hydrophobe de h_{1-2} .** Vue dans l'axe et de côté du segment hélical h_{1-2} . Les surfaces hydrophobes sont indiquées en jaune. Les vues sont orientées avec la matrice vers le bas.

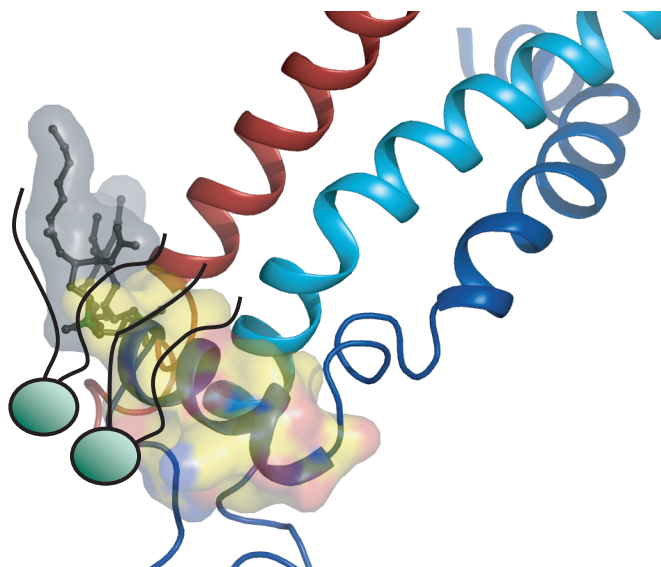


FIG. 5.4 – **D'autres lipides pour protéger h_{1-2} .** Le schéma grossier montre l'emplacement hypothétique de lipides supplémentaires qui doivent protéger la zone hydrophobe de h_{1-2} . Ceux-ci, plutôt que les cardiolipides, pourraient participer à accommoder le mésappariement hydrophobe.

Pourquoi le CDL801 garderait-il une position proche de celle qu'on lui connaît ? Il y a deux éléments de réponse à cette question. Le premier est que quel que soit le mécanisme de transport envisagé, il n'y a pas de raison pour que les extrémités des hélices paires, qui sont couplées aux prolines charnières, subissent de mouvement vertical important. En effet ce ne sont pas ces hélices qui ferment la cavité, et on imagine plutôt le coude se réduire (mouvement des hélices impaires), et le segment hélical matriciel venir se placer en regard (mouvement des boucles autour des résidus glycine appartenant à la signature MCF et placés juste avant les hélices paires). Le deuxième élément de réponse tient à la nécessaire stabilité de l'édifice protéique. Lors d'un changement conformationnel, la structure de l'AAC, déjà moins robuste que la plupart des protéines membranaires de structure connue avec son unique couronne d'hélices, va perdre en stabilité car une partie des interactions côté matriciel vont disparaître. Le maintien exercé par les cardiolipides via ses interactions avec la protéine pourrait aider à conserver une stabilité minimum.

On peut ici envisager deux scénarios : soit l'interaction entre P_A et les résidus G72 et L74 de **h₁₋₂** est maintenue, et c'est cette interaction qui alors définit la limite du mouvement possible de la boucle **M1**. Soit cette interaction est perdue, et le mouvement de **M1** peut avoir une amplitude plus large. Le second scénario, plus plausible, pourrait impliquer une interaction de P_A avec des résidus de **H1** placé en aval du coude dans la zone 30-35 qui viennent se placer à des distances compatibles lors du pivot de **H1** autour de P27 (figure 5.5).

Et à l'intérieur de la protéine, comment cela se passe-t-il ? Si on imagine comme nous le faisons une zone contrainte, interagissant avec la base adénine du nucléotide, une zone de mouvement de plus large amplitude impliquant les hélices **H1** et **H2**, alors les ponts salins à déstabiliser en premier lieu sont ceux formés par E29 (avec D134) et K32 (avec D231). K32 est placé à une distance de 9 Å de P229, ce qui permet une liaison de la base avec Y228, F230 ou même G182 et une attaque du pont salin par le groupement phosphate terminal, compte-tenu de la taille d'une molécule d'ADP.

Farfelu, possible, plausible ? L'ensemble des événements liés au transport esquissés ici sont résumés par le tableau 5.1. Les appuis concrets d'un tel scénario sont uniquement des mesures de distances au sein du modèle atomique : tel résidu interagit avec celui-ci, pourrait interagir avec celui-là... Il s'appuie aussi, indirectement, sur la conservation des résidus, leur appartenance au motif MCF, ainsi qu'à une sélection de références. On peut d'ailleurs noter qu'en opérant une sélection différente il serait possible de proposer un mécanisme similaire pour la zone contrainte mais où **H3** et **H4** seraient les zones de mouvements amples⁶

⁶Il n'y a pas d'ailleurs d'argument structural fort pour privilégier l'une ou l'autre hypothèse. On pourra simplement revoir la figure 8 de la référence Nury et al. [2006] ainsi que le panneau c de la figure 1.8, page 17, pour se convaincre que la boucle **M1** est particulière par rapport aux deux autres, ce qui peut amener à imaginer les mouvements plutôt au niveau de **H1** et **H2**.

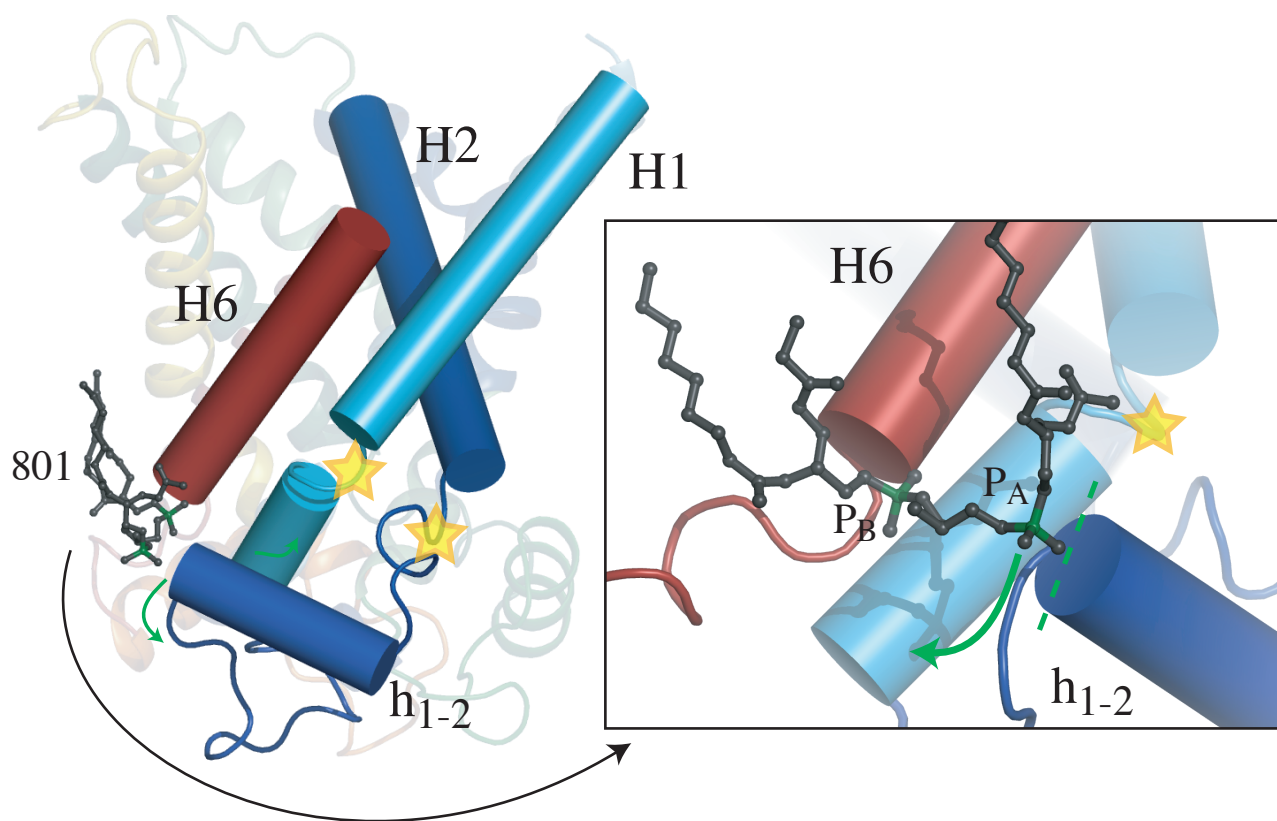


FIG. 5.5 – **CDL801 et points de pivots.** Les hélices **H1**, **H2** et **H6** sont représentées sous forme de cylindres. Les charnières permettant les mouvements conformationnels sont indiquées par des étoiles (P27 et G65 ou G72 respectivement). L'encart souligne une fois de plus la liaison opérée par le CDL801 entre **H6** et **h₁₋₂**. Si P_A n'interagit plus avec cette dernière lors de mouvements, les distances sont compatibles avec une interaction avec des résidus de l'extrémité de **H1** (flèche verte).

Tous les scénarios imaginaires de mécanisme de transport sont bien évidemment sujets à caution. Leur description permet toutefois de rappeler plusieurs faits (l'existence d'une zone angulaire regroupant de nombreux résidus intéressants, l'analyse de l'hydrophobie des segments hélicaux, etc...) qui seraient autrement passés sous silence.

Arrivée de l'ADP depuis l'espace intermembranaire
Interaction des phosphates avec les zones positives
Interaction de la base adénine avec l'échelle de tyrosine
Fixation du nucléotide : la base est non loin de P229
<i>Induced fit</i> : la fixation apporte l'énergie nécessaire pour perturber un (ou les) pont(s) salin(s) K32–D231
L'hélice H1 pivote autour de P27
L'interaction entre P_B du CDL801 et h1-2 est perturbée : la boucle M1 pivote autour de G65 ou G72 Ce même groupement phosphate interagit avec la fin de l'hélice H1

TAB. 5.1 – **Mécanisme schématique du transport de l'ADP.** Ce tableau est un résumé du mécanisme de transport proposé pour l'ADP. Notons qu'il passe allègrement sous silence les événements concomitants concernant le passage d'un ATP (avant, après, en même temps, dans la deuxième sous-unité d'un dimère?).

5.4 Apprentissages

La thèse marque la dernière étape d'un parcours de formation initiale. Son statut hybride, souligné par la possession simultanée d'une carte d'étudiant et d'une carte de crédit alimentée par un salaire, prête parfois à confusion. Ainsi ma grand-mère continue de croire que je révise pour des examens pendant cette période de rédaction, et plus d'une fois, le sourire en coin de mes ex-camarades ingénieurs m'a rappelé que je n'étais pas tout à fait considéré comme un jeune professionnel : « *Ah tu fais une thèse ? Et tu skies beaucoup ? !* »

Un angle d'attaque possible parmi d'autres est d'examiner cette confusion parfois agaçante en terme d'apprentissages. C'est l'une des grandes richesses de la thèse : on apprend beaucoup. La palette est large, elle comprend bien sûr les connaissances scientifiques, mais pas seulement. Sont aussi inclus des savoir-faire (comment aborder l'étude d'une nouvelle protéine, comment écrire un texte scientifique) et des savoir-être (comment présenter ou discuter de ses travaux, comment fonctionne une collaboration).

Par rapport à un autre domaine professionnel, le temps formellement consacré à la formation est important : si on cumule les congrès, les ateliers, deux conférences hebdomadaires en moyenne, la lecture de publications... , au moins 20% du temps de travail lui est dédié.

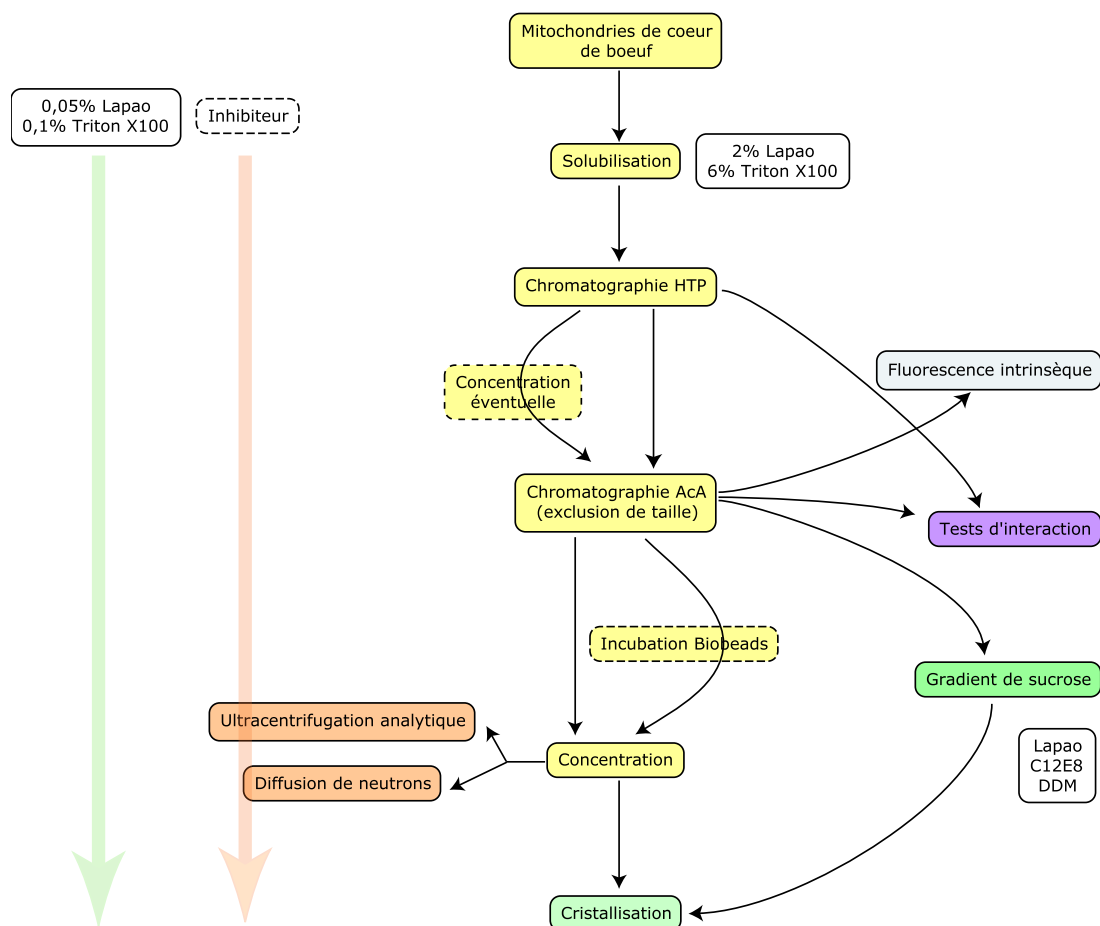
Parmi ces apprentissages, un petit nombre m'apparaissent prééminents. D'abord celui de la rigueur. Ma première leçon mémorable de rigueur est plus ancienne que la thèse, elle eut lieu lorsque mon professeur de mathématiques de maths spé nous inculqua l'usage correct de l'implication et de l'équivalence. Mais les deux suivantes intervinrent à l'IBS : la relecture minutieuse d'un article scientifique, où chaque mot est pesé, chaque référence vérifiée ; la qualité de tenue du cahier de laboratoire, qui permet d'en extraire des expériences vieilles d'une dizaine d'années.

Vient ensuite l'apprentissage de la pugnacité. Une (bonne) partie des expériences ne donnent pas le résultat escompté la première fois, ou ne le donnent jamais. Accepter cette part d'insuccès tout en conservant la dose de motivation nécessaire pour poursuivre est pour moi un acquis primordial, encore en construction.

Enfin –quelle banalité!– je souhaite mettre l'accent sur l'apprentissage du travail collaboratif. Le milieu de la recherche est un milieu de spécialistes, et de passionnés. Il est donc tiraillé entre une forte nécessité de travailler à plusieurs pour bénéficier des spécialités des autres, et un très grand individualisme, qu'on retrouve par exemple dans l'emploi récurrent des adjectifs possessifs : *ma* protéine, *mon* montage... J'ai le sentiment que ces années de thèse m'ont offert l'opportunité de commencer à percevoir ce qui favorise le travail collaboratif tout comme ses points d'achoppement.

Purification de bAAC1

Quels échantillons pour quels usages ? Le schéma ci-dessous rappelle dans les grandes lignes comment sont préparés les différents échantillons destinés aux expériences présentées dans le manuscrit. Il permet d'avoir une vision d'ensemble de ces préparations. Les détails (composition des tampons, temps d'incubation, etc. . .) sont donnés dans le texte, page 42 pour la centrifugation, page 61 pour la diffusion de neutrons, page 72 pour la cristallisation, page 115 pour les tests d'interaction.



Techniques de dosage

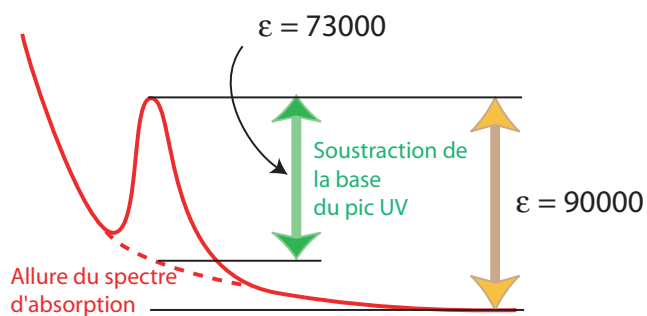
La quantification du détergent La méthode de référence pour mesurer une concentration de détergent est l'emploi de composés radio-marqués. Cette méthode n'est pas d'un usage courant au laboratoire. Parmi les alternatives à la radioactivité on peut citer : le dosage chimique pour certains détergents seulement⁷, la mesure de l'indice de réfraction couplée à la chromatographie d'exclusion de taille⁸, une méthode nouvelle basée sur la mesure de la forme d'une goutte d'échantillon [Kaufmann et al., 2006], une quantification à partir du spectre infrarouge de l'échantillon [daCosta et Baenziger, 2003] qui présente l'avantage de pouvoir aussi quantifier les lipides.

Nous avons testé cette dernière méthode avec le complexe bAAC1-Lapao. Pour cela nous avons utilisé l'appareil du LEDSS placé sous la responsabilité de Didier Gaude. J'ai également pu profiter de l'expérience de John Baenziger, visiteur estival au laboratoire, qui m'a aidé lors d'une série de mesures. Dans le cas spécifique du Lapao, la quantification est très délicate car la structure du détergent fait que ses bandes caractéristiques se superposent à celles de la protéine et des lipides. Il est donc possible uniquement de mesurer des variations importantes de la concentration, de l'ordre de 0,1% (environ 20 fois la CMC!). Cette méthode n'est pas adaptée à notre système.

La quantification de la protéine Nous disposons de trois méthodes pour évaluer la concentration protéique. L'enregistrement du spectre d'absorption dans la gamme 200–500 nm permet d'estimer la hauteur du pic à 280 nm caractéristique de la protéine. La loi de Beer-Lambert donne alors la concentration en protéine. Un dosage colorimétrique suivant le protocole de Lowry qui combine une réaction du biuret (dosage du lien peptidique) et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu (dosage des tyrosines et tryptophanes) permet d'estimer la concentration protéique en comparaison avec une gamme étalon (réalisée avec de la séralbumine bovine dans un tampon contenant du détergent). Il est intéressant de noter qu'une précipitation à l'acide trichloroacétique après complexation au déoxycholate, parfois utilisée pour les protéines membranaires, n'améliore pas le dosage. Enfin l'IBS dispose d'un service de microanalyse en acides aminés après hydrolyse acide, sous la responsabilité de JP Andrieu. C'est pour nous la méthode de référence.

⁷par exemple le DDM et avec lui tous les détergents dont la tête polaire est un sucre [Saha et Brewer, 1994]

⁸qui repose sur le même principe que l'AUC : séparer physiquement le détergent libre des micelles protéine-détergent, puis obtenir une double mesure qui permet de connaître la concentration en protéine (avec l'absorbance à 280 nm en général) puis celle de toutes les autres espèces (avec le changement d'indice) [Strop et Brunger, 2005]



L'emploi de ces différentes méthodes sur le même échantillon permet de déterminer une valeur expérimentale pour ϵ : $73000 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ si on corrige la hauteur du pic à 280 nm par soustraction de la base du pic à plus courte longueur d'onde, $90000 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ autrement. La correspondance entre la méthode de Lowry et la microanalyse en acides aminés est variable, l'écart maximal observé étant une surestimation de 37% de la concentration par la méthode colorimétrique.

Mémento de cristallographie

Cette annexe reprend quelques équations et notions de cristallographie.

Diffusion par une molécule, diffraction par un cristal Commençons par définir la longueur de diffusion atomique b :

$$b = \int_{V_{\text{atome}}} \rho(\mathbf{r}) e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{r}. \quad (1)$$

En général b prend des valeurs réelles qui sont proportionnelles au nombre d'électrons de l'atome considéré. Toutefois, si l'énergie du flux incident est proche de celle d'une orbitale atomique, la densité électronique $\rho(\mathbf{r})$ est déformée : sa symétrie n'est plus sphérique et b peut prendre des valeurs complexes. Ce phénomène est à la base des méthodes de diffusion anormale.

La densité de longueur de diffusion par une molécule s'écrit :

$$B = \frac{1}{V} \sum_{\text{atomes } i} b_i, \quad (2)$$

où V est le volume de la molécule.

Si on considère à présent un cristal, il s'agit d'une assemblée de N molécules identiques et organisées. A partir d'une maille de ce cristal (qui peut contenir une ou généralement plusieurs molécules), on peut obtenir l'ensemble des molécules par translation le long des axes (a, b, c) qui définissent le cristal. La diffusion par l'assemblée des N molécules identiques et organisées qui le composent peut s'écrire, si on décompose $\mathbf{r} = \mathbf{r}^{\text{intra}} + \mathbf{r}_n^{\text{inter}}$, où $\mathbf{r}_n^{\text{inter}}$ est le vecteur qui permet d'obtenir la n -ième molécule par translation de la première ($\mathbf{r}_n^{\text{inter}}$ est du type $x_n \mathbf{a} + y_n \mathbf{b} + z_n \mathbf{c}$).

Avec cette décomposition, on peut alors écrire l'amplitude de diffusion par le cristal entier (pour simplifier les notations, on considère un exemple où on trouve une seule molécule par maille) :

$$B_{\text{cristal}}(\mathbf{q}) = \sum_{\text{molécules } n} B e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_n^{\text{inter}}} \quad (3)$$

Pour une valeur quelconque de \mathbf{q} , la somme des nombres complexes $B e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_n^{\text{inter}}}$ pour les différentes molécules va être nulle. En effet, on ajoute des complexes de même norme et d'arguments « aléatoires » à cause de l'exponentielle complexe.

Les seules valeurs de \mathbf{q} pour lesquelles cette somme est significative sont celles qui vérifient les conditions de Laue :

$$\mathbf{a} \cdot \mathbf{q} = 2\pi h \quad (4)$$

$$\mathbf{b} \cdot \mathbf{q} = 2\pi k \quad (5)$$

$$\mathbf{c} \cdot \mathbf{q} = 2\pi l. \quad (6)$$

Lorsque ces égalités sont vérifiées, les amplitudes diffusées par les différentes molécules du cristal sont en phase et s'additionnent. Si on décompose \mathbf{q} en ses composantes selon les axes du réseau réciproque : $\mathbf{q} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*$, on obtient alors :

$$B_{cristal}(\mathbf{q}) = F_{(h,k,l)} = N \sum_{\text{atomes } i} b_i e^{2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i)}, \quad (7)$$

où (x_i, y_i, z_i) sont les coordonnées réduites dans le référentiel cristallin. Cette expression est appelée facteur de structure pour la tâche de diffraction (h, k, l) . Il représente la transformée de Fourier du contenu de la maille échantillonnée aux sommets du réseau réciproque. En dehors de ces sommets, les amplitudes sommées ne sont plus en phase et l'amplitude totale est de l'ordre de $\frac{1}{N}$ de celle d'un facteur de structure. En conséquence, sur une image de diffraction, entre les taches indicées par (h, k, l) , il n'y a pas d'information.

L'observable enregistrée sur ces images est la seule intensité de la diffraction $I_{(h,k,l)} = |F_{(h,k,l)}|^2$; l'information de phase est donc perdue. La retrouver, résoudre le « problème de la phase » est l'objet des méthodes de diffusion anormale, de remplacement isomorphe ou de remplacement moléculaire si on dispose de la structure d'une protéine homologue.

Une fois les phases connues, on accède à la densité électronique de la molécule / de la maille / du cristal par transformée de Fourier des facteurs de structures :

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{(h,k,l)} F_{(h,k,l)} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (8)$$

Groupes d'espaces Le groupe d'espace d'un cristal est la description de la symétrie de la structure cristalline. Il naît de la combinaison d'un groupe ponctuel de symétrie et d'un réseau de Bravais. Le groupe ponctuel de symétrie décrit les opérations de symétrie qui laissent invariant le cristal; le réseau de Bravais représente la périodicité de la distribution des atomes dans le cristal.

Dans notre cas, les deux groupes d'espace d'intérêt sont $P2_12_12$ et $C222_1$. Ces deux groupes appartiennent à la famille orthorhombique. Cela signifie que les trois axes de la maille sont orthogonaux. La lettre P signale un réseau primitif (les noeuds du réseau sont seulement aux sommets de la maille) et la lettre C un réseau à face centrée (il y a un noeud en plus au centre de la face définie par les axes \mathbf{a} et \mathbf{b}). Le groupe ponctuel de symétrie est défini par les chiffres 2_12_12 et 222_1 . Le chiffre 2 représente une rotation de π radians autour d'un axe, et 2_1 représente une rotation de π autour d'un axe, suivie d'une translation d'une demi-maille dans la direction de l'axe. L'ordre des symboles donne la direction des axes : dans le cas du groupe $C222_1$, une rotation de π autour de \mathbf{a} , une rotation de π autour de \mathbf{b} , et un axe hélicoïdal autour de \mathbf{c} .

Dans l'empilement cristallin de la forme centrée le monomère B est obtenu par rotation de π autour de l'axe \mathbf{b} à partir de A, tout comme le monomère C qui provient lui de la maille voisine.

Clonage, expression et purification de bCyD

1. PCR réalisé sur l'ADNc de bCyD cloné dans le vecteur pCMV-sport6 avec :

oligonucléotide sens interne, construction courte

GAA AAT CTG TAT TTT CAG GGC TCC GGG AAC CCG CTA GTG TAC CTG

oligonucléotide sens interne, construction longue

GAA AAT CTG TAT TTT CAG GGC GTT CGC GTT TGC AGC AGC GGC AGC

oligonucléotide sens externe

XXX XXX XXX XXX XXX⁹ GAA AAT CTG TAT TTT CAG GGC

oligonucléotide antisens interne

C CGC AGT CTT GTG ATG ACG ATC TTT CTT GGA CGT C

oligonucléotide antisens externe

XXX XXX XXX XXX XXX CTA GCT CAA CTG GCC CGC AGT CTT GTG ATG ACG

PCR réalisée avec polymérase Phusion, et un ratio 1 :10 entre les oligonucléotides internes et externes.

30 secondes à 98°C

35 cycles : 10 secondes à 98°C, 30 secondes à 55°C, 15 secondes à 72°C

8 minutes à 72°C

2. Purification du fragment de PCR sur gel d'agarose avec le kit Qiagen.

3. Hybridation avec le vecteur pLIM01 préparé par digestion avec la T4 polymérase.

4. Transformation de la souche DH5 α de *E. coli*.

5. Miniprep (kit Qiagen) et sélection de l'ADN des clones possédant l'insert ; vérification des séquences (Génome Express).

6. Transformation de la souche BL21(DE3) de *E. coli*.

7. Induction de la surexpression par IPTG 1 mM à DO_{600nm} =0,6.

8. Culture pendant cinq heures à 20°C.

9. Reprise du culot dans le tampon A (100mM Hepes pH 8, 150 mM NaCl) supplémenté en antiprotéases (Complete EDTA-free, Roche), imidazole 20 mM.

10. Lyse des cellules par presse de French ou lyse chimique (BugBuster de XX).

11. Ultracentrifugation dans un rotor Ti45 à 40000 rpm pendant 30 minutes.

Purification de la fraction soluble

12. Injection du surnageant sur une colonne Hitrap Nickel (GE lifescience) équilibrée en tampon A. 1mL de résine par litre de culture.

⁹Les séquences LIC utilisées sont protégées par un brevet qui empêche leur divulgation.

13. Elution par un gradient linéaire en concentration d'imidazole pour atteindre 500 mM en 5 volumes de colonne.

14. Analyse sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

Purification de la fraction insoluble

15. Reprise du culot dans le tampon A supplémenté par 6 M d'urée.

16. Ultracentrifugation dans un rotor Ti70 à 40000 rpm pendant 30 minutes.

17. Injection du surnageant sur une colonne Hitrap Nickel (GE lifescience) équilibrée en tampon A. 1mL de résine par litre de culture.

18. Elution par un gradient linéaire en concentration d'imidazole pour atteindre 500 mM en 5 volumes de colonne.

19. Analyse sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

Expression et purification de hCyD_t

1. Induction de la surexpression par IPTG 1 mM à DO_{600nm}=0,6.
2. Culture pendant cinq heures à 30°C.
3. Reprise du culot dans le tampon A (100mM Hepes pH 8, 150 mM NaCl) supplémenté en antiprotéases (Complete Roche), imidazole 20 mM.
4. Lyse des cellules par presse de French.
5. Ultracentrifugation dans un rotor Ti45 à 40000 rpm pendant 30 minutes.
6. Injection du surnageant sur une colonne SP-sepharose (GE lifescience) équilibrée en tampon A. 8 mL de résine par litre de culture.
7. Elution par un gradient linéaire en concentration de NaCl pour atteindre 500 mM en 5 volumes de colonne.
8. Analyse sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes et sélection des fractions d'intérêt.
9. Dialyse en tampon A.
10. Injection sur une colonne Mono-Q (GE lifescience) équilibrée en tampon A. La protéine n'est pas retenue sur la résine.
11. Concentration sur Millipore 10 kDa
12. Injection sur une colonne Superdex 200 hiload 16/60 (GE lifescience) équilibrée en 50 mM de phosphate de potassium pH 7,3 supplémenté par 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM NaCl puis élution à 0,8 mL/min.
13. Concentration finale sur Millipore 10 kDa jusqu'à 30 mg/mL.

Quantifier des interactions par la résonance plasmonique de surface

La présentation des expériences de résonance plasmonique de surface (SPR) est longue –et peut-être un peu fastidieuse– comparée à l'importance des résultats obtenus. Pour cette raison je ne l'ai pas intégrée au texte. Il me semble toutefois intéressant d'en rendre compte, ne serait-ce que pour souligner les écueils rencontrés. C'est l'objet de cette annexe, un peu plus longue qu'il n'est coutume.

Principe et méthodes de SPR

Un système de détection utilisant la SPR permet de quantifier l'interaction entre molécules et la formation de complexes. L'un des partenaires formant le complexe doit être immobilisé sur une surface. Les appareils commercialisés par la marque *Biacore AB* associent une telle détection à un système d'injection et de transfert de liquide ; ils disposent également de logiciels d'analyse cinétique des interactions mesurées. La facilité d'utilisation de l'appareil, l'apparente facilité d'obtention de résultats (constantes cinétiques d'interaction) expliquent la popularité et la réussite de *Biacore AB*.

Principe Lors de la réflexion totale d'un faisceau laser sur une surface d'un matériau riche en électrons libres, il peut se produire un phénomène de résonance entre ceux-ci et l'onde évanescente produite près de la surface. Ce phénomène entraîne une chute d'intensité de la lumière réfléchie à un angle donné, variable suivant l'indice de réfraction du milieu situé près de la surface, dans le champ évanescent. Les variations de masse induite par la formation de complexes impliquant des molécules greffées sur la surface modifient cet indice et peuvent donc être mesurées. Le signal de résonance est quantifié en unité de résonance arbitraire (RU). Une variation de 1000 RU correspond à une déviation de l'angle de résonance de $0,1^\circ$ et à une variation de masse de 1 ng.mm^{-2} .

Une courbe de SPR, également appelée sensorgramme, comprend en général trois phases. On a d'abord la phase d'association pendant laquelle le partenaire est injecté sur la surface dans un tampon bien choisi. Cette phase se caractérise par un signal croissant si l'interaction a lieu. A la fin de l'injection vient la phase de dissociation pendant laquelle c'est un tampon seul qui est injecté, et où le signal décroît. Une phase de régénération permet d'éliminer les restes de partenaires fixés à la surface et qui génèrent les enregistrements ultérieurs. Elle correspond à l'injection de solution de lavage (par exemple du sel, du détergent...).

Matériel utilisé J'ai utilisé un *Biacore 3000* –qui permet l'acquisition simultanée de 4 signaux–, les logiciels *BiaEval* et *Excel* pour le traitement des données. Les protéines ont été immobilisées sur des surfaces de type CM3 (un support de verre recouvert d'or fonctionnalisé avec des groupes carboxyles), CM4 ou CM5

(qui possèdent une couche de dextran fonctionnalisé au-dessus du dépôt en or, permettant une immobilisation plus importante ; le dextran est plus dense pour les surfaces CM5), L1 (la surface de dextran possède des groupements hydrophobes qui permettent la reconstitution de bicouches lipidiques).

A l'IBS les expériences de Biacore sont en général menées par campagne : on dispose de l'appareil pendant une semaine. J'ai réalisé six campagnes, dont deux consacrées aux interactions de l'AAC avec la cyclophiline et Vpr. Ce sont les seules décrites ici.

Immobilisation Les protéines ont été immobilisées soit par couplage covalent entre leurs résidus amines et les groupes carboxyles des surfaces, grâce à un hydroxysuccinimide ; soit par l'intermédiaire d'une interaction biotine-streptavidine. Dans ce dernier cas la cyclophiline D est biotinylée non spécifiquement ; le peptide Vpr porte une biotine en C-ter. Les surfaces Biacore sont alors préalablement recouvertes de streptavidine¹⁰. Il s'agit de conditions classiques d'immobilisation.

Pistes contrôles Les pistes contrôles sont préparées comme les pistes fonctionnalisées, les injections de Vpr ou hCyD_t sont remplacées par des injections de tampon ou de BSA respectivement.

Normalisation Il est coutumier d'enregistrer un ensemble de spectres à différentes concentrations de l'analyte¹¹ de afin de remonter aux paramètres cinétiques de l'interaction ; ces spectres se distinguent par le niveau d'association, croissant avec la concentration. On tire en général des informations de spectres différences, c'est-à-dire de courbes issues de la soustraction entre une piste où la protéine d'intérêt est immobilisée et d'une piste contrôle. Il peut également être utile de soustraire le signal obtenu avec une concentration nulle en analyte :

$$I_{norm} = \left(I_{prot}^{[ligand]=i} - I_{prot}^{[a]=0} \right) - \left(I_{controle}^{[ligand]=i} - I_{controle}^{[a]=0} \right) \quad (9)$$

avec I_{norm} l'intensité normalisée utilisable, $I_{prot}^{[ligand]=i}$ l'intensité enregistrée sur la piste fonctionnalisée avec la protéine (partenaire 1) lors de l'injection du ligand (partenaire 2) à la concentration i , $I_{controle}$ l'intensité enregistrée sur la piste non fonctionnalisée avec la protéine d'intérêt.

La soustraction de la piste contrôle permet théoriquement de s'affranchir des interactions non-spécifiques entre l'analyte et la surface, et la soustraction du signal à concentration nulle permet de s'affranchir des interactions entre les composants du tampon de l'analyte et la surface.

¹⁰La séquence d'injections est la suivante, à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$: 70 μL NHS+EDC, 50 μL de streptavidine en 10 mM acétate de sodium pH 4,5, 70 μL d'éthanolamine-HCl 1M pH 8,5, deux fois 5 μL NaCl 1M.

¹¹Les injections sont typiquement de 120 μL à un débit de 60 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Résultats concernant l'interaction avec Vpr ou hCyD_t

Des résultats variables et parfois contradictoires Mes expériences d'interaction quantifiée par SPR ne sont pas faciles à présenter et à interpréter. En effet des expériences ressemblantes ou semblables ont pu donner des résultats différents. Nous ne savons pas analyser certains de ces résultats.

Il eut été plus simple de ne présenter que les courbes qui sont en accord avec l'absence d'interaction. Les expériences de Biacore auraient alors confirmé les expériences de biochimie. Toutefois la réalité est plus complexe. J'ai donc fait le choix d'une présentation peut être un peu trop exhaustive, mais qui souligne les variations, les incohérences entre expériences similaires lorsqu'elles existent.

Régénération des surfaces Deux campagnes d'expériences ont été réalisées. Lors de la première campagne : 1. les échantillons utilisés étaient les mêmes que ceux qui ont servi pour les essais de rétention sur résine et 2. Nous avons employé un protocole de régénération¹² peu adapté, celui de [Jacotot et al., 2001]. Ainsi, pour éliminer des surfaces l'AAC qui s'y était fixé, nous injectons du sel à une concentration molaire. Cette régénération, trop douce, ne permet pas d'éliminer totalement la protéine (ou les micelles non protéiques).

Lors de la seconde campagne, les conditions de régénération étaient au point (NaCl 1 M et SDS 0,1% dans le tampon de course, identiques à Sabbah et al. [2006]). Nous disposions néanmoins d'une variété d'échantillons moins grande.

La figure 6 présente l'évolution de la ligne de base du signal au cours des mesures successives, pour deux des surfaces préparées.

¹²Les injections de régénération sont typiquement de 5 μ L à 60 μ L/min, répétées plusieurs fois.

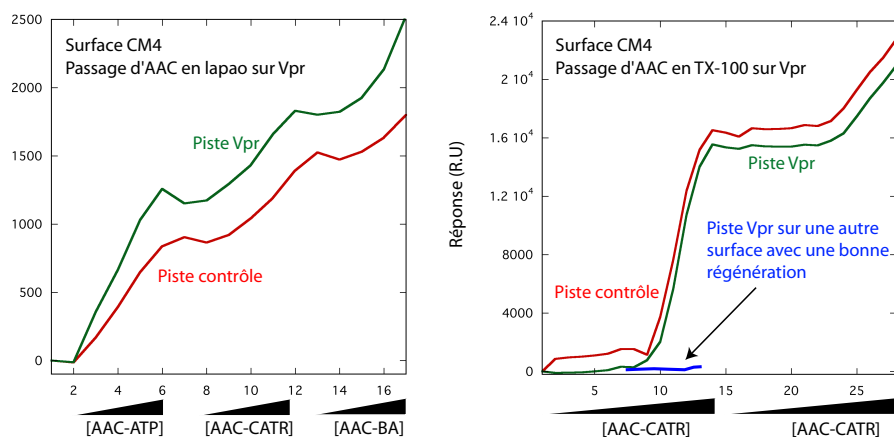


FIG. 6 – Dérive de la ligne de base lorsque la régénération est incomplète.

Deux exemples d'évolution au cours des mesures successives de la ligne de base sont donnés. Il s'agit de deux surfaces semblables sur lesquelles nous avons fixé Vpr par sa biotine après une fonctionnalisation à la streptavidine. On voit que lorsque les concentrations injectées d'AAC sont fortes (de l'ordre de 1 mM au maximum) on a une augmentation importante de la ligne de base à chaque nouvelle mesure. Cela signifie que des composants des échantillons protéiques se sont fixés à la surface et ne se détachent pas. Cela peut inclure des phénomènes d'auto-association. Les courbes verte et rouge représentent respectivement la piste fonctionnalisée avec Vpr et le contrôle. On voit que pour le panneau de gauche la fixation est plus forte sur la piste avec Vpr, mais ce n'est pas le cas pour le panneau de droite. Dans ce dernier panneau j'ai représenté l'évolution de la ligne de base pour une série de mesures après changement des conditions de régénération. Cette courbe est constante et proche de zéro.

Les expériences effectuées Le tableau ci-dessous donne les caractéristiques des mesures réalisées pendant les deux campagnes.

Echantillon d'AAC						Partenaire		
Det.	Lig.	Date	Asso. ?	Fix.	Fig.	Part.	Immo.	
Vpr								
Campagne 1 – surface CM4								
Lapao	ATP	26/10	oui	889	7-a	Vpr	889	biotine
Lapao	CATR	26/10	non	889	7-b	Vpr	889	biotine
Lapao	BA	26/10	oui	889	7-c	Vpr	889	biotine
TX-100	CATR	30/10	oui	800	7-d	Vpr	1650	biotine
TX-100	CATR	30/10	peu	800	7-e	Vpr	1650	biotine
Lapao	ATP	2/11	peu	800	7-f	Vpr	1650	biotine
Campagne 2 – surface CM3								
Lapao	CATR	26/10	non	800	7-g	Vpr	350	biotine
Lapao et lipides sans protéine			non	0	9-a	Vpr	350	biotine
Campagne 2 – surface CM4								
Lapao	CATR	26/10	peu	1632	7-h	Vpr	1632	biotine
Lapao	BA	26/10	peu	1632	7-i	Vpr	1632	biotine
Lapao et lipides sans protéine			non	0	9-b	Vpr	1632	biotine
Cyclophiline D								
Campagne 1 – surface CM4								
Lapao	ATP	26/10	oui	800	8-a	hCyD _t	297	biotine
Lapao	CATR	26/10	non	800	8-b	hCyD _t	297	biotine
Lapao	BA	26/10	oui	800	8-c	hCyD _t	297	biotine
Campagne 2 – surface CM3								
Lapao	CATR	26/10	non	800	8-d	hCyD _t	80	biotine
Lapao	CATR	26/10	non	800	8-e	hCyD _t	650	directe
Lapao et lipides sans protéine			non	0	9-c	hCyD _t	650	directe

TAB. 2 – **Récapitulatif des mesures d'interaction par SPR.** On voit que les expériences concernant Vpr sont plus nombreuses. L'explication en est toute simple : nous avons plus longtemps cru à l'interaction entre l'AAC et Vpr.

Description des surfaces Les expériences illustrées par la figure 7.a à 7.c et la figure 8.a à 8.c utilisent une surface de type CM4 avec une piste contrôle, une piste fonctionnalisée par streptavidine puis Vpr (immobilisation 889 RU), une piste fonctionnalisée par streptavidine puis hCyD_t-biotine.

Les expériences illustrées par la figure 7.d à 7.f utilisent une deuxième surface de type CM4 avec une piste contrôle et une piste fonctionnalisée par streptavidine puis Vpr (immobilisation 1650 RU).

Les expériences illustrées par les figures 7.g, 8.d et 8.e utilisent une surface de type CM3, dépourvue de dextran. Les surfaces CM3 peuvent minimiser les inter-

actions non spécifiques avec le composé injecté ; on les emploie par exemple lors de suspicions de telles interactions. Cette surface comprend une piste contrôle, une piste fonctionnalisée par streptavidine puis Vpr (immobilisation 889 RU), une piste fonctionnalisée par streptavidine puis hCyD_t-biotine (immobilisation faible de l'ordre de 100 RU, dûe sans doute à une mauvaise biotinylation du lot de hCyD_t), une piste fonctionnalisée par hCyD_t directement.

Enfin les expériences illustrées par la figure 7.h et 7.i utilisent une troisième surface de type CM4 avec une piste contrôle et une piste fonctionnalisée par streptavidine puis Vpr (immobilisation 1650 RU).

Description des courbes avec Vpr Quand cela n'est pas précisé, les courbes sont enregistrées sur des surfaces de type CM4.

La figure **7-a** montre l'injection d'un échantillon protéique de bAAC1 en **Lapao** en présence d'**ATP** sur une surface fonctionnalisée avec Vpr. Les courbes sont correctement empilées. Aux faibles concentrations, on observe un phénomène d'interaction non-spécifique avec la surface contrôle (valeurs en dessous de zéro). Ce phénomène est contrebalancé par une interaction spécifique aux concentrations plus élevées. On observe une saturation pour la concentration la plus haute.

Rappel : cette série d'injections correspond à une **régénération problématique**.

La figure **7-b** montre l'injection d'un échantillon protéique de bAAC1 en **Lapao** en présence de **CATR**. Les courbes ne sont pas correctement empilées. Il n'y a pas d'interaction nette de cet échantillon avec la surface.

Rappel : cette série d'injections correspond à une **régénération problématique**.

La figure **7-c** montre l'injection d'un échantillon protéique de bAAC1 en **Lapao** en présence de **BA**. Les courbes sont correctement empilées. On observe le même double effet que pour l'échantillon en présence d'ATP (non-spécifique puis spécifique).

Rappel : cette série d'injections correspond à une **régénération problématique**.

Les trois séries précédentes correspondent à des injections séquentielles (en présence d'ATP puis de CATR et enfin de BA). La ligne de base suit une forte déviation lors de cette séquence. Il est néanmoins intéressant de constater qu'on observe une interaction en présence de BA après n'en avoir pas vu en présence de CATR. Nous pouvons donc exclure le scénario d'une « saturation » de la surface qui expliquerait l'absence d'interaction en présence de CATR.

La figure **7-d** montre l'injection d'un échantillon protéique de bAAC1 en **Triton X100** en présence de **CATR** sur une surface fonctionnalisée avec Vpr. **Cette série de mesures est particulièrement intéressante**. Les courbes sont correctement empilées. Aux faibles concentrations, on observe un phénomène d'interaction non-spécifique rapide avec la surface contrôle (valeurs en dessous de zéro). On a en effet une décroissance suivie d'un minima des courbes. La position de ce minima est de plus en plus précoce lorsque la concentration en protéine augmente. Après le minima, on observe une interaction spécifique. Pour les concentrations les plus élevées, c'est ce seul phénomène que l'on voit.

L'explication la plus plausible est alors celle d'une double interaction : la première non spécifique avec la surface Biacore affecte plus la surface contrôle. Elle est de cinétique rapide, et l'emporte donc au début de la mise en contact pour les faibles

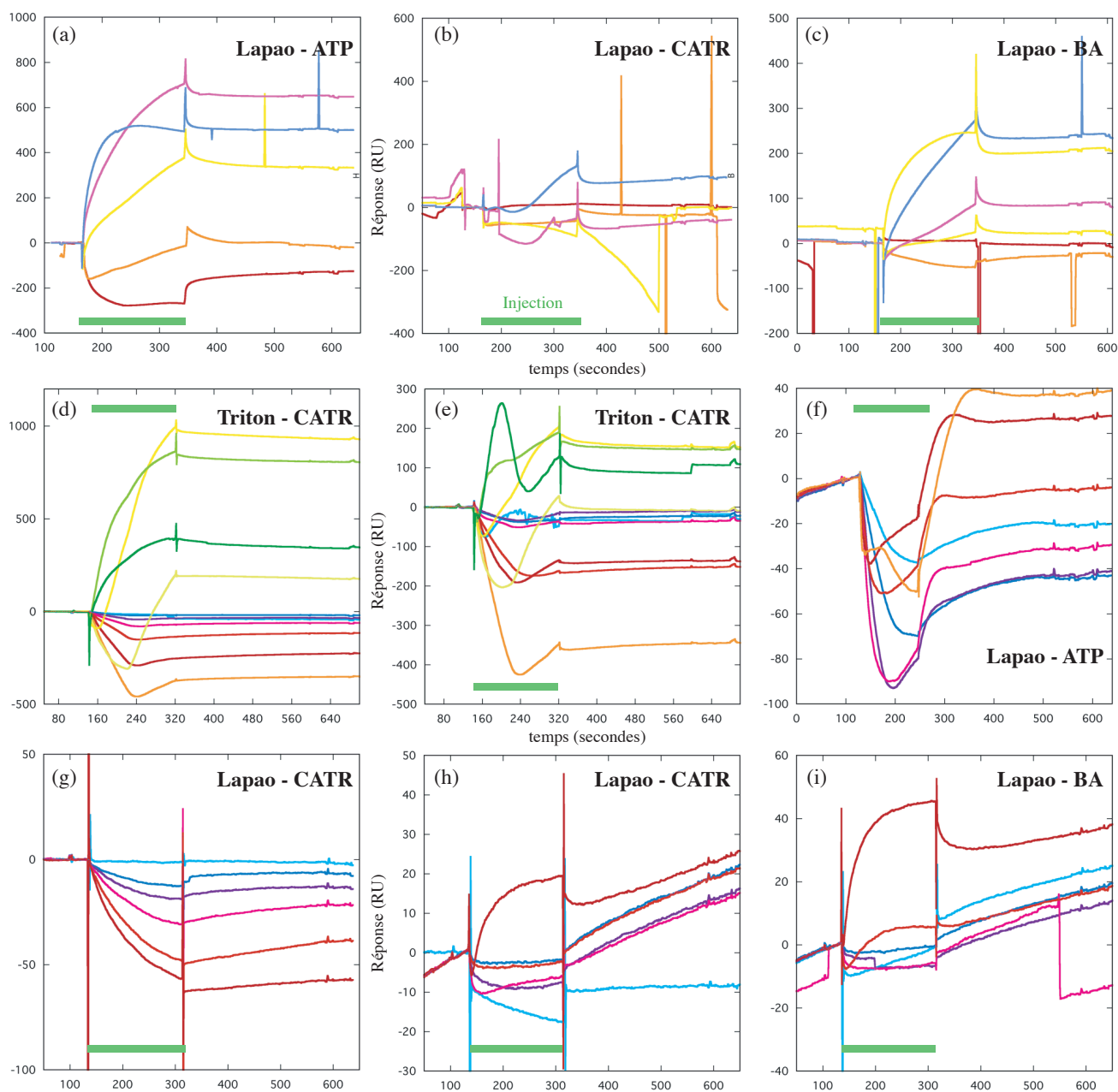


FIG. 7 – Mesures de SPR pour le couple bAAC1-Vpr. Les différents panneaux sont décrits dans le texte, le trait vert correspond à la durée de l'injection.

concentrations en protéine. La seconde interaction est spécifique, elle affecte plus la surface fonctionnalisée, et avec une intensité qui dépend de la concentration.

Rappel : cette série d'injections correspond à une **régénération problématique**.

La figure **7-e** montre l'injection d'un échantillon protéique de bAAC1 en **Triton X100** en présence de **CATR** sur une surface fonctionnalisée avec Vpr. **Cette série de mesure est exactement la même que la précédente**. Son allure est pourtant bien différente. Les courbes sont plus ou moins bien empilées. L'amplitude des variations est de l'ordre de 1/5 de ce qu'on observe pendant la première série de mesures. Rappel : cette série d'injections correspond à une **régénération problématique**, et la déviation de la ligne de base pendant la série qui la précède est énorme. On peut donc penser qu'on assiste à un phénomène de « saturation ».

La figure **7-f** montre l'injection d'un échantillon protéique de bAAC1 en **Lapao** en présence d'**ATP**. Les courbes ne sont pas correctement empilées. Il n'y a pas d'interaction nette de cet échantillon avec la surface, cela peut s'expliquer dans le cadre de la saturation de la surface. Rappel : cette série d'injections correspond à une **régénération problématique**.

La figure **7-g** montre l'injection d'un échantillon protéique de bAAC1 en **Lapao** en présence de **CATR** sur **une surface de type CM3**. Les courbes sont correctement empilées, mais donnent une réponse négative.

La figure **7-h** montre l'injection d'un échantillon protéique de bAAC1 en **Lapao** en présence de **CATR**. La figure **7-i** montre l'injection d'un échantillon protéique de bAAC1 en **Lapao** en présence de **BA**. Ces deux séries de courbes présentent un faible effet spécifique.

Description des courbes avec hCyD_t Quand cela n'est pas précisé, les courbes sont enregistrées sur des surfaces de type CM4.

Les figures **8-a**, **8-b**, **8-c** montrent l'injection d'un échantillon protéique de bAAC1 en **Lapao** en présence d'**ATP**, de **CATR** et de **BA** respectivement, sur une surface fonctionnalisée avec Vpr. Les courbes sont correctement empilées. Aux faibles concentrations, on observe un phénomène d'interaction non-spécifique avec la surface contrôle (valeurs en dessous de zéro). Ce phénomène est contrebalancé par une interaction spécifique aux concentrations plus élevées. Les intensités des phénomènes sont très fortes, et on peut largement douter de leur pertinence biologique (il paraît impossible de fixer autant d'AAC sur une surface avec aussi peu de cyclophiline). Rappel : cette série d'injections correspond à une **régénération problématique**.

Les figures **8-d** et **8-e** montrent l'injection d'un échantillon protéique de bAAC1 en **Lapao** en présence de **CATR**, sur une surface de hCyD_t immobilisée par biotinylation et directement avec ses lysines respectivement. Les courbes ne sont pas correctement empilées pour le couplage biotine. Il n'y a pas d'interaction nette de cet échantillon avec la surface. L'interaction est plus convaincante, au niveau de l'empilement et de l'intensité de la réponse, pour le couplage direct.

Description des courbes avec un mélange de Lapao et de lipides L'injection d'un mélange de lipides caractéristiques de la membrane interne et de Lapao

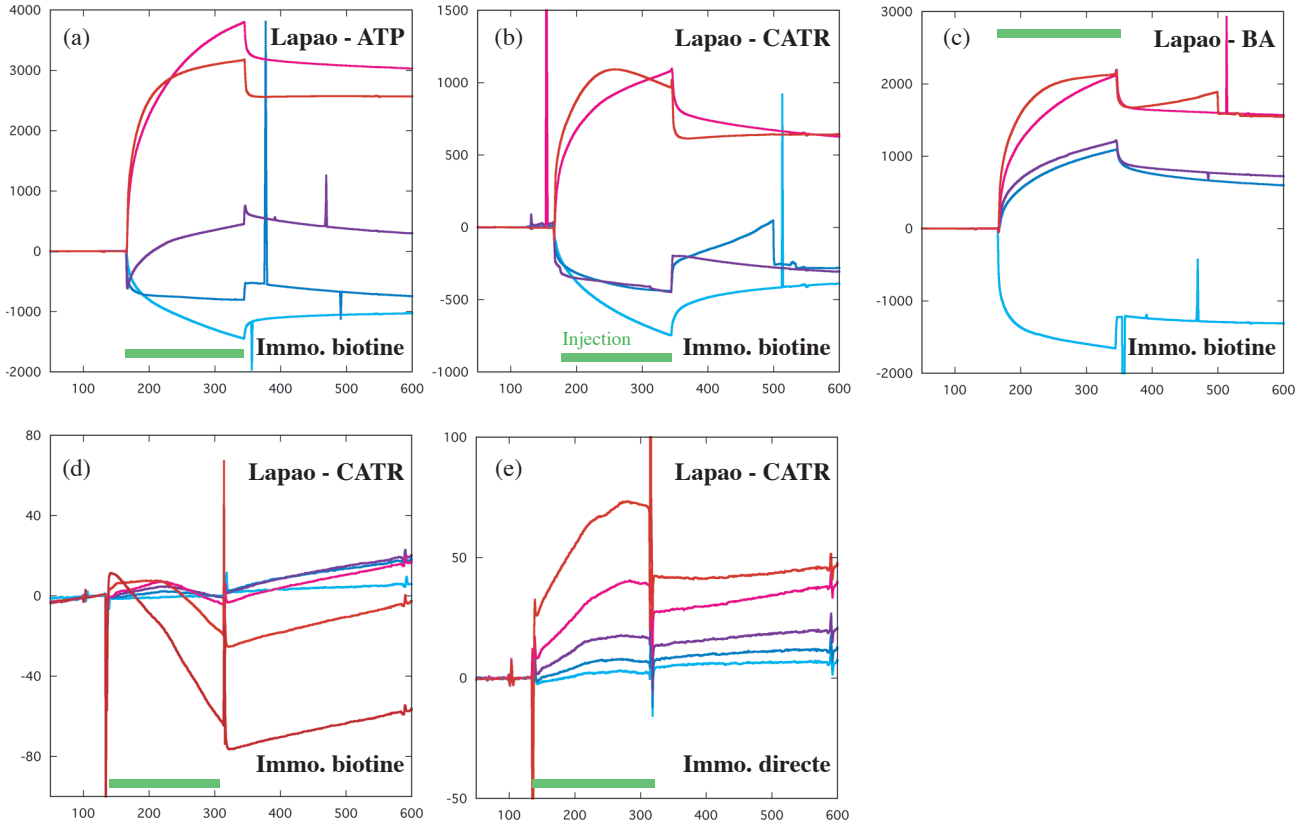


FIG. 8 – Mesures de SPR pour le couple bAAC1-hCyD_t. Les différents panneaux sont décrits dans le texte, le trait vert correspond à la durée de l'injection.

à la concentration attendue dans les échantillons protéiques permet de vérifier qu'il n'y a pas d'interaction directe non spécifique entre ces espèces et les partenaires de l'AAC. Les trois graphes de la figure 9 montrent des courbes plates caractéristiques d'une absence d'interaction.

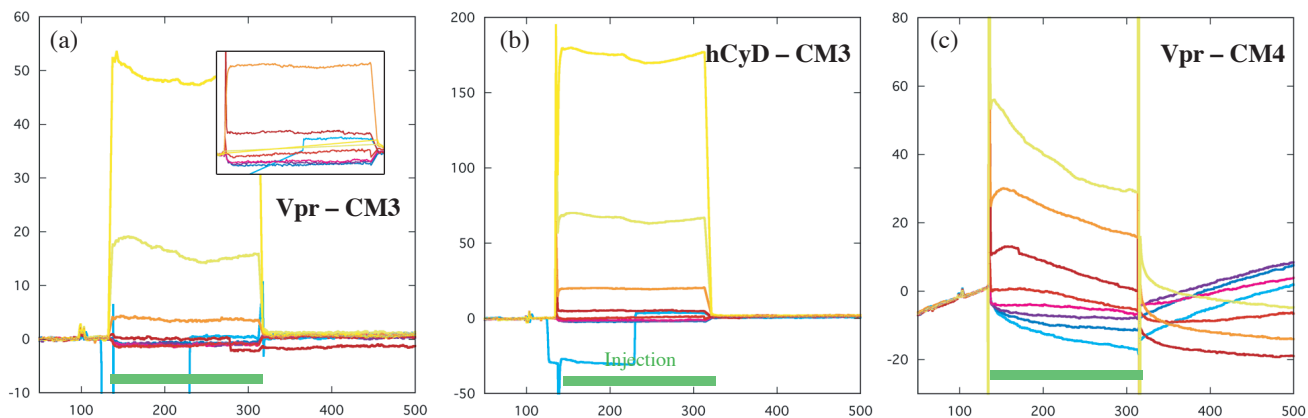


FIG. 9 – Mesures de SPR avec un mélange Lapao-lipides. Les différents panneaux sont décrits dans le texte, le trait vert correspond à la durée de l'injection.

Programmes utilisés

Les programmes utilisés lors des travaux puis de la rédaction de cette thèse sont regroupés par thème :

Ultracentrifugation analytique

- Sedfit et Sedfat, logiciels d'analyse des données développés par Peter Schulk
- Sednterp, pour le calcul de volumes partiels spécifiques
- Maple pour la représentation des couples (\bar{v}_{d+l}, B)

Diffusion de neutrons

- Maple pour le calcul de la diffusion par un complexe protéine-détergent

Cristallographie

- Denzo et Scalepack pour l'indexation et la mise à l'échelle des données
- La suite ccp4 pour la réduction des données
- CNS pour l'affinement
- O puis Coot, plus convivial, pour la construction des modèles
- Pymol pour visualiser les structures et préparer les figures

Préparation du manuscript

- Texshop pour la rédaction du texte
- Bibdesk pour la gestion des références bibliographiques
- Photoshop et Illustrator pour la préparation des figures
- Kaleidagraph pour la réalisation des graphiques

Divers

- Clustal pour les alignements de séquences

Publications

1. Nury H, Dahout-Gonzalez C, Trezeguet V, Lauquin G, Brandolin G, Pebay-Peyroula E. **Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers.** FEBS Lett. 2005 ; 579 :6031-6.
2. Biou V, Bosecke P, Bois JM, Brandolin G, Kahn R, Mas C, Nauton L, Nury H, Pebay-Peyroula E, Vicat J, Stuhmann H. **X-ray spectroscopy and X-ray diffraction at wavelengths near the K-absorption edge of phosphorus.** J Synchrotron Radiat. 2005 12 :402-9.
3. Nury H, Dahout-Gonzalez C, Trezeguet V, Lauquin G, Brandolin G, Pebay-Peyroula E. **Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier.** Annual Review of Biochemistry 2006.
4. Dahout-Gonzalez C, Nury H, Trezeguet V, Lauquin G, Pebay-Peyroula E, Brandolin G. **Molecular, functional and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier.** Physiology 2006 242-9.

Bibliographie

- H Aquila, W Eiermann, W Babel, et M Klingenberg. Isolation of the adp/atp translocator from beef heart mitochondria as the bongkrekate-protein complex. *Eur J Biochem*, 85(2) :549–560, 1978.
- H Aquila, D Misra, M Eulitz, et M Klingenberg. Complete amino acid sequence of the adp/atp carrier from beef heart mitochondria. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 363(3) :345–349, 1982.
- Masafumi Arai, Masami Ikeda, et Toshio Shimizu. Comprehensive analysis of transmembrane topologies in prokaryotic genomes. *Gene*, 304 :77–86, 2003.
- Genevieve Arselin, Jacques Vaillier, Benedicte Salin, Jacques Schaeffer, Marie-France Giraud, Alain Dautant, Daniel Brethes, et Jean Velours. The modulation in subunits e and g amounts of yeast atp synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem*, 279(39) :40392–40399, 2004.
- C Aslanidis et P J de Jong. Ligation-independent cloning of pcr products (lic-pcr). *Nucleic Acids Res*, 18(20) :6069–6074, 1990.
- Mitsuo Ataka et Nobuko I Wakayama. Effects of a magnetic field and magnetization force on protein crystal growth. why does a magnet improve the quality of some crystals? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58(Pt 10 Pt 1) :1708–1710, 2002.
- T Azarashvili, D Grachev, O Krestinina, Y Evtodienko, I Yurkov, V Papadopoulos, et G Reiser. The peripheral-type benzodiazepine receptor is involved in control of ca(2+)-induced permeability transition pore opening in rat brain mitochondria. *Cell Calcium*, 2006.
- Heftsi Azoulay-Zohar, Adrian Israelson, Salah Abu-Hamad, et Varda Shoshan-Barmatz. In self-defence : hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J*, 377(Pt 2) :347–355, 2004.
- Svetlana Bahatyrova, Raoul N Frese, C Alistair Siebert, John D Olsen, Kees O Van Der Werf, Rienk Van Grondelle, Robert A Niederman, Per A Bullough, Cees Otto, et C Neil Hunter. The native architecture of a photosynthetic membrane. *Nature*, 430(7003) :1058–1062, 2004.
- H D Bakker, H R Scholte, C Van den Bogert, W Ruitenbeek, J A Jeneson, R J Wanders, N G Abeling, B Dorland, R C Sengers, et A H Van Gennip. Deficiency of

- the adenine nucleotide translocator in muscle of a patient with myopathy and lactic acidosis : a new mitochondrial defect. *Pediatr Res*, 33(4 Pt 1) :412–417, 1993.
- L Bamber, M Harding, P J Butler, et E R Kunji. Yeast mitochondrial adp/atp carriers are monomeric in detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(44) :16224–16229, 2006.
- Emy Basso, Lisa Fante, Jonathan Fowlkes, Valeria Petronilli, Michael A Forte, et Paolo Bernardi. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin d. *J Biol Chem*, 280(19) :18558–18561, 2005.
- Doron M Behar, Ene Metspalu, Toomas Kivisild, Alessandro Achilli, Yarin Hadid, Shay Tzur, Luisa Pereira, Antonio Amorim, Lluís Quintana-Murci, Kari Majamaa, Corinna Herrnstadt, Neil Howell, Oleg Balanovsky, Ildus Kutuev, Andrey Pshenichnov, David Gurwitz, Batsheva Bonne-Tamir, Antonio Torroni, Richard Villems, et Karl Skorecki. The matrilineal ancestry of ashkenazi jewry : portrait of a recent founder event. *Am J Hum Genet*, 78(3) :487–497, 2006.
- P Bernardi et V Petronilli. The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel : a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr*, 28(2) :131–138, 1996.
- K Beyer et M Klingenberg. Adp/atp carrier protein from beef heart mitochondria has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by ³¹p nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 24(15) :3821–3826, 1985.
- K Beyer et B Nuscher. Specific cardiolipin binding interferes with labeling of sulfhydryl residues in the adenosine diphosphate/adenosine triphosphate carrier protein from beef heart mitochondria. *Biochemistry*, 35(49) :15784–15790, 1996.
- F Bisaccia, L Capobianco, M Mazzeo, et F Palmieri. The mitochondrial oxoglutarate carrier protein contains a disulfide bridge between intramembraneous cysteines 221 and 224. *FEBS Lett*, 392(1) :54–58, 1996.
- M R Block, G Zaccai, G J Lauquin, et P V Vignais. Small angle neutron scattering of the mitochondrial adp/atp carrier protein in detergent. *Biochem Biophys Res Commun*, 109(2) :471–477, 1982.
- M Bogdanov et W Dowhan. Phospholipid-assisted protein folding : phosphatidylethanolamine is required at a late step of the conformational maturation of the polytopic membrane protein lactose permease. *EMBO J*, 17(18) :5255–5264, 1998.
- M J Borgnia, D Kozono, G Calamita, P C Maloney, et P Agre. Functional reconstitution and characterization of aqpz, the e. coli water channel protein. *J Mol Biol*, 291(5) :1169–1179, 1999.
- D Boyd, C Schierle, et J Beckwith. How many membrane proteins are there? *Protein Sci*, 7(1) :201–205, 1998.
- Katrin Brandner, Peter Rehling, et Kaye N Truscott. The carboxyl-terminal third of the dicarboxylate carrier is crucial for productive association with the inner membrane twin-pore translocase. *J Biol Chem*, 280(7) :6215–6221, 2005.
- G Brandolin, J Doussiere, A Gulik, T Gulik-Krzywicki, G J Lauquin, et P V Vignais. Kinetic, binding and ultrastructural properties of the beef heart adenine nucleotide carrier protein after incorporation into phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 592(3) :592–614, 1980.

- G Brandolin, Y Dupont, et P V Vignais. Substrate-induced fluorescence changes of the isolated adp/atp carrier protein in solution. *Biochem Biophys Res Commun*, 98 (1) :28–35, 1981.
- G Brandolin, Y Dupont, et P V Vignais. Exploration of the nucleotide binding sites of the isolated adp/atp carrier protein from beef heart mitochondria. 2. probing of the nucleotide sites by formycin triphosphate, a fluorescent transportable analogue of atp. *Biochemistry*, 21(25) :6348–6353, 1982.
- G Brandolin, F Boulay, P Dalbon, et P V Vignais. Orientation of the n-terminal region of the membrane-bound adp/atp carrier protein explored by antipeptide antibodies and an arginine-specific endoprotease. evidence that the accessibility of the n-terminal residues depends on the conformational state of the carrier. *Biochemistry*, 28(3) :1093–1100, 1989.
- G Brandolin, A Le Saux, V Trezeguet, G J Lauquin, et P V Vignais. Chemical, immunological, enzymatic, and genetic approaches to studying the arrangement of the peptide chain of the adp/atp carrier in the mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr*, 25(5) :459–472, 1993.
- Cecile Breyton, Winfried Haase, Tom A Rapoport, Werner Kuhlbrandt, et Ian Collinson. Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex secYeg. *Nature*, 418(6898) :662–665, 2002.
- N Brustovetsky, E Bamberg, T Gropp, et M Klingenberg. Biochemical and physical parameters of the electrical currents measured with the adp/atp carrier by photolysis of caged adp and atp. *Biochemistry*, 36(45) :13865–13872, 1997.
- A Bruni, A Contessa, et S Luciani. Atractyloside as inhibitor of energy transfert in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 60 :301–11, 1962.
- N Brustovetsky et M Klingenberg. Mitochondrial adp/atp carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca^{2+} . *Biochemistry*, 35(26) :8483–8488, 1996.
- N Brustovetsky, M Tropschug, S Heimpel, D Heidkämper, et M Klingenberg. A large Ca^{2+} -dependent channel formed by recombinant adp/atp carrier from *Neurospora crassa* resembles the mitochondrial permeability transition pore. *Biochemistry*, 41 (39) :11804–11811, 2002.
- L Capobianco, A Ferramosca, et V Zara. The mitochondrial tricarboxylate carrier of silver eel : dimeric structure and cytosolic exposure of both n- and c-termini. *J Protein Chem*, 21(8) :515–521, 2002.
- N Chalazonitis, R Chagneux, et A Arvanitaki. [rotation of external segments of photoreceptors in constant magnetic field]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 271(1) :130–133, 1970.
- P Champeil, T Menguy, C Tribet, J L Popot, et M le Maire. Interaction of amphipols with sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -atpase. *J Biol Chem*, 275(25) :18623–18637, 2000.
- Chen Chen, Young Ko, Michael Delannoy, Steven J Ludtke, Wah Chiu, et Peter L Pedersen. Mitochondrial atp synthasome : three-dimensional structure by electron microscopy of the atp synthase in complex formation with carriers for pi and adp/atp. *J Biol Chem*, 279(30) :31761–31768, 2004.

- V Cherezov, H Fersi, et M Caffrey. Crystallization screens : compatibility with the lipidic cubic phase for in meso crystallization of membrane proteins. *Biophys J*, 81(1) :225–242, 2001.
- V Cherezov, E Yamashita, W Liu, M Zhalnina, W A Cramer, et M Caffrey. In meso structure of the cobalamin transporter, btub, at 1.95 a resolution. *J Mol Biol*, 364(4) :716–734, 2006a.
- Vadim Cherezov, Avinash Peddi, Lalitha Muthusubramaniam, Yuan F Zheng, et Martin Caffrey. A robotic system for crystallizing membrane and soluble proteins in lipidic mesophases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60(Pt 10) :1795–1807, 2004.
- Vadim Cherezov, Jeffrey Clogston, Miroslav Z Papiz, et Martin Caffrey. Room to move : crystallizing membrane proteins in swollen lipidic mesophases. *J Mol Biol*, 357(5) :1605–1618, 2006b.
- Arnaud Chevrollier, Dominique Loiseau, Beatrice Chabi, Gilles Renier, Olivier Douay, Yves Malthiery, et Georges Stepien. Ant2 isoform required for cancer cell glycolysis. *J Bioenerg Biomembr*, 37(5) :307–316, 2005.
- I Collinson, C Breyton, F Duong, C Tziatzios, D Schubert, E Or, T Rapoport, et W Kuhlbrandt. Projection structure and oligomeric properties of a bacterial core protein translocase. *EMBO J*, 20(10) :2462–2471, 2001.
- Emily M Coonrod, Mary Anne Karren, et Janet M Shaw. Ugo1p is a multipass transmembrane protein with a single carrier domain required for mitochondrial fusion. *Traffic*, 8(5) :500–511, 2007.
- M Crompton, S Virji, et J M Ward. Cyclophilin-d binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem*, 258(2) :729–735, 1998.
- Corrie J B daCosta et John E Baenziger. A rapid method for assessing lipid :protein and detergent :protein ratios in membrane-protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59(Pt 1) :77–83, 2003.
- C Dahout-Gonzalez, G Brandolin, et E Pebay-Peyroula. Crystallization of the bovine adp/atp carrier is critically dependent upon the detergent-to-protein ratio. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59(Pt 12) :2353–2355, 2003.
- P Dalbon, G Brandolin, F Boulay, J Hoppe, et P V Vignais. Mapping of the nucleotide-binding sites in the adp/atp carrier of beef heart mitochondria by photolabeling with 2-azido[alpha-32p]adenosine diphosphate. *Biochemistry*, 27(14) :5141–5149, 1988.
- C Daniele, S Dahamna, O Firuzi, N Sekfali, L Saso, et G Mazzanti. Atractylis gummifera l. poisoning : an ethnopharmacological review. *J Ethnopharmacol*, 97(2) :175–181, 2005.
- C De Marcos Lousa, V Trézéguet, A C Dianoux, G Brandolin, et G J Lauquin. The human mitochondrial adp/atp carriers : kinetic properties and biogenesis of wild-type and mutant proteins in the yeast *s. cerevisiae*. *Biochemistry*, 41(48) :14412–14420, 2002.

- B M Denker, B L Smith, F P Kuhajda, et P Agre. Identification, purification, and partial characterization of a novel mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem*, 263(30) :15634–15642, 1988.
- Marcus Deschauer, Gavin Hudson, Tobias Muller, Robert W Taylor, Patrick F Chinnery, et Stephan Zierz. A novel ant1 gene mutation with probable germline mosaicism in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord*, 15(4) :311–315, 2005.
- A C Dianoux, F Noel, C Fiore, V Trezeguet, S Kieffer, M Jaquinod, G J Lauquin, et G Brandolin. Two distinct regions of the yeast mitochondrial adp/atp carrier are photolabeled by a new adp analogue : 2-azido-3'-o-naphthoyl-[beta-32p]adp. identification of the binding segments by mass spectrometry. *Biochemistry*, 39(37) : 11477–11487, 2000.
- A Doerner, M Pauschinger, A Badorff, M Noutsias, S Giessen, K Schulze, J Bilger, U Rauch, et H P Schultheiss. Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans. *FEBS Lett*, 414(2) :258–262, 1997.
- V Dolce, P Scarcia, D Iacopetta, et F Palmieri. A fourth adp/atp carrier isoform in man : identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett*, 579(3) :633–637, 2005.
- Max Dolder, Bernd Walzel, Oliver Speer, Uwe Schlattner, et Theo Wallimann. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem*, 278(20) :17760–17766, 2003.
- Andrea Dorner, Stefanie Giessen, Regina Gaub, Helga Grosse Siestrup, Peter L Schwimmbeck, Roland Hetzer, Wolfgang Poller, et Heinz-Peter Schultheiss. An isoform shift in the cardiac adenine nucleotide translocase expression alters the kinetic properties of the carrier in dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*, 8(1) : 81–89, 2006.
- W Dowhan. Molecular basis for membrane phospholipid diversity : why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem*, 66 :199–232, 1997.
- J Drews. Drug discovery : a historical perspective. *Science*, 287(5460) :1960–1964, 2000.
- T Drgon, L Sabova, N Nelson, et J Kolarov. Adp/atp translocator is essential only for anaerobic growth of yeast *saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 289(2) :159–162, 1991.
- E D Duee et P V Vignais. [exchange between extra- and intramitochondrial adenine nucleotides]. *Biochim Biophys Acta*, 107(1) :184–188, 1965.
- Y Dupont, G Brandolin, et P V Vignais. Exploration of the nucleotide binding sites of the isolated adp/atp carrier protein from beef heart mitochondria. 1. probing of the nucleotide sites by naphthoyl-atp, a fluorescent nontransportable analogue of atp. *Biochemistry*, 21(25) :6343–6347, 1982.
- J Duszynski, K Bogucka, G Letko, U Kuster, W Kunz, et L Wojtczak. Relationship between the energy cost of atp transport and atp synthesis in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 637(2) :217–223, 1981.

Bibliographie

- S D Dyal, S C Agius, C De Marcos Lousa, V Trezeguet, et K Tokatlidis. The dynamic dimerization of the yeast adp/atp carrier in the inner mitochondrial membrane is affected by conserved cysteine residues. *J Biol Chem*, 278(29) :26757–26764, 2003.
- M Endres, W Neupert, et M Brunner. Transport of the adp/atp carrier of mitochondria from the tom complex to the tim22.54 complex. *EMBO J*, 18(12) :3214–3221, 1999.
- R M Epand. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta*, 1376(3) :353–368, 1998.
- Salem Faham et James U Bowie. Bicelle crystallization : a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. *J Mol Biol*, 316(1) :1–6, 2002.
- M Falah et R S Gupta. Cloning of the hsp70 (dnak) genes from rhizobium meliloti and pseudomonas cepacia : phylogenetic analyses of mitochondrial origin based on a highly conserved protein sequence. *J Bacteriol*, 176(24) :7748–7753, 1994.
- K F Ferri, E Jacotot, J Blanco, J A Este, N Zamzami, S A Susin, Z Xie, G Brothers, J C Reed, J M Penninger, et G Kroemer. Apoptosis control in syncytia induced by the hiv type 1-envelope glycoprotein complex : role of mitochondria and caspases. *J Exp Med*, 192(8) :1081–1092, 2000.
- G Fiermonte, V Dolce, R Arrigoni, M J Runswick, J E Walker, et F Palmieri. Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier : evolution of the carrier family. *Biochem J*, 344 Pt 3 :953–960, 1999.
- Flavia Fontanesi, Luigi Palmieri, Pasquale Scarcia, Tiziana Lodi, Claudia Donnini, Anna Limongelli, Valeria Tiranti, Massimo Zeviani, Iliana Ferrero, et Anna Maria Viola. Mutations in aac2, equivalent to human adp-associating ant1 mutations, lead to defective oxidative phosphorylation in saccharomyces cerevisiae and affect mitochondrial dna stability. *Hum Mol Genet*, 13(9) :923–934, 2004.
- Dimitrios Fotiadis, Yan Liang, Slawomir Filipek, David A Saperstein, Andreas Engel, et Krzysztof Palczewski. Atomic-force microscopy : Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature*, 421(6919) :127–128, 2003.
- Oleksandr Gakh, Patrizia Cavadini, et Grazia Isaya. Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta*, 1592(1) :63–77, 2002.
- A Galat. Peptidylproline cis-trans-isomerases : immunophilins. *Eur J Biochem*, 216(3) :689–707, 1993.
- T Galvez, B Duthey, J Kniazeff, J Blahos, G Rovelli, B Bettler, L Prezeau, et J P Pin. Allosteric interactions between gb1 and gb2 subunits are required for optimal gaba(b) receptor function. *EMBO J*, 20(9) :2152–2159, 2001.
- A M Giudetti, L Siculella, et G V Gnani. Citrate carrier activity and cardiolipin level in eel (*anguilla anguilla*) liver mitochondria. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 133(2) :227–234, 2002.
- Yann Gohon, Georgy Pavlov, Peter Timmins, Christophe Tribet, Jean-Luc Popot, et Christine Ebel. Partial specific volume and solvent interactions of amphipol a8-35. *Anal Biochem*, 334(2) :318–334, 2004.

- Rui Pedro Goncalves, Nikolay Buzhynskyy, Valerie Prima, James N Sturgis, et Simon Scheuring. Supramolecular assembly of vDAC in native mitochondrial outer membranes. *J Mol Biol*, 369(2) :413–418, 2007.
- Valentin I Gordeliy, Ramona Schlesinger, Rouslan Efremov, Georg Buldt, et Joachim Heberle. Crystallization in lipidic cubic phases : a case study with bacteriorhodopsin. *Methods Mol Biol*, 228 :305–316, 2003.
- B H Graham, K G Waymire, B Cottrell, I A Trounce, G R MacGregor, et D C Wallace. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet*, 16(3) :226–234, 1997.
- N Grigorieff. Three-dimensional structure of bovine NADH :ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice. *J Mol Biol*, 277(5) :1033–1046, 1998.
- T Gropp, N Brustovetsky, M Klingenberg, V Müller, K Fendler, et E Bamberg. Kinetics of electrogenic transport by the ADP/ATP carrier. *Biophys J*, 77(2) :714–726, 1999.
- Lan Guan, Irina N Smirnova, Gill Verner, Shushi Nagamori, et H Ronald Kaback. Manipulating phospholipids for crystallization of a membrane transport protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(6) :1723–1726, 2006.
- H Hackenberg et M Klingenberg. Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate-adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100. *Biochemistry*, 19(3) :548–555, 1980.
- T Haitina, J Lindblom, T Renström, et R Fredriksson. Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. *Genomics*, 88(6) :779–790, 2006.
- Andrew P Halestrap et Catherine Brenner. The adenine nucleotide translocase : a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem*, 10(16) :1507–1525, 2003.
- M Hashimoto, E Majima, S Goto, Y Shinohara, et H Terada. Fluctuation of the first loop facing the matrix of the mitochondrial ADP/ATP carrier deduced from intermolecular cross-linking of Cys56 residues by bifunctional dimaleimides. *Biochemistry*, 38(3) :1050–1056, 1999.
- T Hatanaka, M Hashimoto, E Majima, Y Shinohara, et H Terada. Functional expression of the tandem-repeated homodimer of the mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 262(3) :726–730, 1999.
- R A Haworth et D R Hunter. Control of the mitochondrial permeability transition pore by high-affinity ADP binding at the ADP/ATP translocase in permeabilized mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 32(1) :91–96, 2000.
- B Hoffmann, A Stöckl, M Schlame, K Beyer, et M Klingenberg. The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. *J Biol Chem*, 269(3) :1940–1944, 1994.

Bibliographie

- S G Huang, S Odoy, et M Klingenberg. Chimers of two fused adp/atp carrier monomers indicate a single channel for adp/atp transport. *Arch Biochem Biophys*, 394(1) :67–75, 2001.
- Carola Hunte et Hartmut Michel. Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments. *Curr Opin Struct Biol*, 12(4) :503–508, 2002.
- Carola Hunte, Emanuela Screpanti, Miro Venturi, Abraham Rimón, Etana Padan, et Hartmut Michel. Structure of a na⁺/h⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by ph. *Nature*, 435(7046) :1197–1202, 2005.
- F J Hüther et B Kadenbach. Reactivity of the -sh groups of the mitochondrial phosphate carrier under native, solubilized and reconstituted conditions. *Eur J Biochem*, 143(1) :79–82, 1984.
- S Iwata, J W Lee, K Okada, J K Lee, M Iwata, B Rasmussen, T A Link, S Ramaswamy, et B K Jap. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science*, 281(5373) :64–71, 1998.
- E Jacotot, K F Ferri, C El Hamel, C Brenner, S Druillennec, J Hoebeke, P Rustin, D Metivier, C Lenoir, M Geuskens, H L Vieira, M Loeffler, A S Belzacq, J P Briand, N Zamzami, L Edelman, Z H Xie, J C Reed, B P Roques, et G Kroemer. Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with hiv-1 viral protein rr and bcl-2. *J Exp Med*, 193(4) :509–519, 2001.
- Lilian Jacquamet, Jeremy Ohana, Jacques Joly, Franck Borel, Michel Pirocchi, Philippe Charraut, Alain Bertoni, Pascale Israel-Gouy, Philippe Carpentier, Frank Kozielski, Delphine Blot, et Jean-Luc Ferrer. Automated analysis of vapor diffusion crystallization drops with an x-ray beam. *Structure*, 12(7) :1219–1225, 2004.
- B Jacrot. The study of biological structures by neutrons scattering from solution. *Rep. Prog. Phys.*, 39 :911–953, 1976.
- B Jacrot et G Zaccaï. Determination of molecular weight by neutron scattering. *Biopolymers*, 20 :2423–2426, 1981.
- F Jiang, H S Rizavi, et M L Greenberg. Cardiolipin is not essential for the growth of *saccharomyces cerevisiae* on fermentable or non-fermentable carbon sources. *Mol Microbiol*, 26(3) :481–491, 1997.
- F Jiang, M T Ryan, M Schlame, M Zhao, Z Gu, M Klingenberg, N Pfanner, et M L Greenberg. Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem*, 275(29) :22387–22394, 2000.
- Eric Z Jordens, Luigi Palmieri, Marjan Huizing, Lambert P van den Heuvel, Rob C A Sengers, Andrea Dorner, Wim Ruitenbeek, Frans J Trijbels, Jullius Valsson, Gunnlaugur Sigfusson, Ferdinando Palmieri, et Jan A M Smeitink. Adenine nucleotide translocator 1 deficiency associated with sengers syndrome. *Ann Neurol*, 52(1) :95–99, 2002.
- B Kadenbach, P Mende, H V Kolbe, I Stipani, et F Palmieri. The mitochondrial phosphate carrier has an essential requirement for cardiolipin. *FEBS Lett*, 139(1) :109–112, 1982.

- Gergely Katona, Ulf Andreasson, Ehud M Landau, Lars-Erik Andreasson, et Richard Neutze. Lipidic cubic phase crystal structure of the photosynthetic reaction centre from rhodobacter sphaeroides at 2.35a resolution. *J Mol Biol*, 331(3) :681–692, 2003.
- Thomas C Kaufmann, Andreas Engel, et Herve-W Remigy. A novel method for detergent concentration determination. *Biophys J*, 90(1) :310–317, 2006.
- J Kaukonen, J K Juselius, V Tiranti, A Kyttala, M Zeviani, G P Comi, S Keranen, L Peltonen, et A Suomalainen. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtdna maintenance. *Science*, 289(5480) :782–785, 2000.
- Yoshitaka Kihira, Akihiro Iwahashi, Eiji Majima, Hiroshi Terada, et Yasuo Shinohara. Twisting of the second transmembrane alpha-helix of the mitochondrial adp/atp carrier during the transition between two carrier conformational states. *Biochemistry*, 43(48) :15204–15209, 2004.
- M Klingenberg. The adp-atp translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport. *J Membr Biol*, 56(2) :97–105, 1980.
- M Klingenberg et M Appel. The uncoupling protein dimer can form a disulfide cross-link between the mobile c-terminal sh groups. *Eur J Biochem*, 180(1) :123–131, 1989.
- M Klingenberg, P Riccio, et H Aquila. Isolation of the adp, atp carrier as the carboxyatractylate . protein complex from mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 503(2) :193–210, 1978.
- M H Koch, P Vachette, et D I Svergun. Small-angle scattering : a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q Rev Biophys*, 36(2) :147–227, 2003.
- Jason E Kokoszka, Katrina G Waymire, James E Sligh, Shawn E Levy, S P Amy, Grant R MacGregor, et Douglas C Wallace. Genetic inactivation of adenine nucleotide translocator 2 (anc2) in mouse results in cardiac insufficiency and embryonic lethality. *Mitochondrion*, 1(S57), 2001.
- Jason E Kokoszka, Katrina G Waymire, Shawn E Levy, James E Sligh, Jiyang Cai, Dean P Jones, Grant R MacGregor, et Douglas C Wallace. The adp/atp translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, 427(6973) :461–465, 2004.
- M Kolbe, H Besir, L O Essen, et D Oesterhelt. Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 a resolution. *Science*, 288(5470) :1390–1396, 2000.
- Hirofumi Komaki, Toshiyuki Fukazawa, Hideki Houzen, Kazuto Yoshida, Ikuya Nonaka, et Yu-ichi Goto. A novel d104g mutation in the adenine nucleotide translocator 1 gene in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia patients with mitochondrial dna with multiple deletions. *Ann Neurol*, 51(5) :645–648, 2002.
- R Kotaria, J A Mayor, D E Walters, et R S Kaplan. Oligomeric state of wild-type and cysteine-less yeast mitochondrial citrate transport proteins. *J Bioenerg Biomembr*, 31(6) :543–549, 1999.

Bibliographie

- Alexandra Krauskopf, Ove Eriksson, William J Craigen, Michael A Forte, et Paolo Bernardi. Properties of the permeability transition in *vdac1*(-/-) mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1757(5-6) :590–595, 2006.
- E R Kunji et M Harding. Projection structure of the atractyloside-inhibited mitochondrial adp/atp carrier of *saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 278(39) : 36985–36988, 2003.
- E R Kunji et A J Robinson. The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers. *Biochim Biophys Acta*, 1757(9-10) :1237–1248, 2006.
- Genji Kurisu, Huamin Zhang, Janet L Smith, et William A Cramer. Structure of the cytochrome *b6f* complex of oxygenic photosynthesis : tuning the cavity. *Science*, 302(5647) :1009–1014, 2003.
- D Lairez et J Pelta. Diffusion de neutrons aux petits angles : application à l'étude des macromolécules biologiques en solution. *Journal de Physique*, 1, 2004.
- E M Landau et J P Rosenbusch. Lipidic cubic phases : a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(25) :14532–14535, 1996.
- M le Maire, P Champeil, et J V Moller. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta*, 1508(1-2) :86–111, 2000.
- K Le-Quoc et D Le-Quoc. Crucial role of sulfhydryl groups in the mitochondrial inner membrane structure. *J Biol Chem*, 260(12) :7422–7428, 1985.
- A G Lee. How lipids interact with an intrinsic membrane protein : the case of the calcium pump. *Biochim Biophys Acta*, 1376(3) :381–390, 1998.
- M Joanne Lemieux, Jinmei Song, Myong Jin Kim, Yafei Huang, Anthony Villa, Manfred Auer, Xiao-Dan Li, et Da-Neng Wang. Three-dimensional crystallization of the *escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter : a member of the major facilitator superfamily. *Protein Sci*, 12(12) :2748–2756, 2003.
- Giorgio Lenaz, Alessandra Baracca, Romana Fato, Maria Luisa Genova, et Giancarlo Solaini. Mitochondrial complex i : structure, function, and implications in neurodegeneration. *Ital J Biochem*, 55(3-4) :232–253, 2006.
- K Li, C K Warner, J A Hodge, S Minoshima, J Kudoh, R Fukuyama, M Maekawa, Y Shimizu, N Shimizu, et D C Wallace. A human muscle adenine nucleotide translocator gene has four exons, is located on chromosome 4, and is differentially expressed. *J Biol Chem*, 264(24) :13998–14004, 1989.
- C S Lin et M Klingenberg. Characteristics of the isolated purine nucleotide binding protein from brown fat mitochondria. *Biochemistry*, 21(12) :2950–2956, 1982.
- C S Lin, H Hackenberg, et E M Klingenberg. The uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria is a dimer. a hydrodynamic study. *FEBS Lett*, 113(2) : 304–306, 1980.
- Y Liu, M Gerstein, et D M Engelman. Transmembrane protein domains rarely use covalent domain recombination as an evolutionary mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10) :3495–3497, 2004.

- H Luecke, B Schobert, J K Lanyi, E N Spudich, et J L Spudich. Crystal structure of sensory rhodopsin ii at 2.4 angstroms : insights into color tuning and transducer interaction. *Science*, 293(5534) :1499–1503, 2001.
- E Majima, H Koike, Y M Hong, Y Shinohara, et H Terada. Characterization of cysteine residues of mitochondrial adp/atp carrier with the sh-reagents eosin 5-maleimide and n-ethylmaleimide. *J Biol Chem*, 268(29) :22181–22187, 1993.
- E Majima, K Ikawa, M Takeda, M Hashimoto, Y Shinohara, et H Terada. Translocation of loops regulates transport activity of mitochondrial adp/atp carrier deduced from formation of a specific intermolecular disulfide bridge catalyzed by copper-o-phenanthroline. *J Biol Chem*, 270(49) :29548–29554, 1995.
- E Majima, N Yamaguchi, H Chuman, Y Shinohara, M Ishida, S Goto, et H Terada. Binding of the fluorescein derivative eosin y to the mitochondrial adp/atp carrier : characterization of the adenine nucleotide binding site. *Biochemistry*, 37(1) :424–432, 1998.
- C A Mannella. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta*, 1762(2) :140–147, 2006.
- D Marsh et L I Horvath. Structure, dynamics and composition of the lipid-protein interface. perspectives from spin-labelling. *Biochim Biophys Acta*, 3 :267–296, 1998.
- F H Marshall, J White, M Main, A Green, et A Wise. Gaba(b) receptors function as heterodimers. *Biochem Soc Trans*, 27(4) :530–535, 1999.
- I Marzo, C Brenner, N Zamzami, J M Jurgensmeier, S A Susin, H L Vieira, M C Prevost, Z Xie, S Matsuyama, J C Reed, et G Kroemer. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, 281(5385) :2027–2031, 1998.
- P Mayinger, E Winkler, et M Klingenberg. The adp/atp carrier from yeast (aac-2) is uniquely suited for the assignment of the binding center by photoaffinity labeling. *FEBS Lett*, 244(2) :421–426, 1989.
- Rafael Medina, Deisy Perdomo, et Jose Bubis. The hydrodynamic properties of dark- and light-activated states of n-dodecyl beta-d-maltoside-solubilized bovine rhodopsin support the dimeric structure of both conformations. *J Biol Chem*, 279(38) :39565–39573, 2004.
- Lisa V Misquitta, Yohann Misquitta, Vadim Cherezov, Orla Slattery, Jakkam M Mohan, David Hart, Mariya Zhalnina, William A Cramer, et Martin Caffrey. Membrane protein crystallization in lipidic mesophases with tailored bilayers. *Structure*, 12(12) :2113–2124, 2004.
- Y Misquitta et M Caffrey. Detergents destabilize the cubic phase of monoolein : implications for membrane protein crystallization. *Biophys J*, 85(5) :3084–3096, 2003.
- P Mitchell. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191 :144–148, 1961.

Bibliographie

- M Monné, A J Robinson, C Boes, M E Harbour, I M Fearnley, et E R Kunji. The mimivirus genome encodes a mitochondrial carrier that transports datp and dttp. *J Virol*, 2007.
- Hiroyuki Mori, Tomoya Tsukazaki, Ryoji Masui, Seiki Kuramitsu, Shigeyuki Yokoyama, Arthur E Johnson, Yoshiaki Kimura, Yoshinori Akiyama, et Koreaki Ito. Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein translocase. secye from thermus thermophilus hb8 forms a constitutive oligomer in membranes. *J Biol Chem*, 278(16) :14257–14264, 2003.
- L Napoli, A Bordoni, M Zeviani, G M Hadjigeorgiou, M Sciacco, V Tiranti, A Terentiou, M Moggio, A Papadimitriou, G Scarlato, et G P Comi. A novel missense adenine nucleotide translocator-1 gene mutation in a greek adpeo family. *Neurology*, 57(12) :2295–2298, 2001.
- D C Neugebauer et A E Blaurock. Magnetic orientation of purple membranes demonstrated by optical measurements and neutron scattering. *FEBS Lett*, 78(1) :31–35, 1977.
- W Neupert et J M Herrmann. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 2007.
- P Nollert, H Qiu, M Caffrey, J P Rosenbusch, et E M Landau. Molecular mechanism for the crystallization of bacteriorhodopsin in lipidic cubic phases. *FEBS Lett*, 504(3) :179–186, 2001.
- H Nury, C Dahout-Gonzalez, V Trézéguet, G Lauquin, G Brandolin, et E Pebay-Peyroula. Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial adp/atp carrier monomers. *FEBS Lett*, 579(27) :6031–6036, 2005.
- H Nury, C Dahout-Gonzalez, V Trézéguet, G J Lauquin, G Brandolin, et E Pebay-Peyroula. Relations between structure and function of the mitochondrial adp/atp carrier. *Annu Rev Biochem*, 75 :713–741, 2006.
- A Oberai, Y Ihm, S Kim, et J U Bowie. A limited universe of membrane protein families and folds. *Protein Sci*, 15(7) :1723–1734, 2006.
- Takayuki Odahara. Stability and solubility of integral membrane proteins from photosynthetic bacteria solubilized in different detergents. *Biochim Biophys Acta*, 1660(1-2) :80–92, 2004.
- Koji Okamoto et Janet M Shaw. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 39 :503–536, 2005.
- F Palmieri. The mitochondrial transporter family (slc25) : physiological and pathological implications. *Pflugers Arch*, 447(5) :689–709, 2004.
- F Palmieri, G Agrimi, E Blanco, A Castegna, M A Di Noia, V Iacobazzi, F M Lasorsa, C M Marobbio, L Palmieri, P Scarcia, S Todisco, A Vozza, et J Walker. Identification of mitochondrial carriers in saccharomyces cerevisiae by transport assay of reconstituted recombinant proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1757(9-10) :1249–1262, 2006.

- L Palmieri, H Rottensteiner, W Girzalsky, P Scarcia, F Palmieri, et R Erdmann. Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *EMBO J*, 20(18) :5049–5059, 2001.
- A Palmisano, V Zara, A Hönliger, A Vozza, P J Dekker, N Pfanner, et F Palmieri. Targeting and assembly of the oxoglutarate carrier : general principles for biogenesis of carrier proteins of the mitochondrial inner membrane. *Biochem J*, 333 (Pt 1) : 151–158, 1998.
- H Palsdottir et C Hunte. Lipids in membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta*, 1666(1-2) :2–18, 2004.
- E Pebay-Peyroula et G Brandolin. Nucleotide exchange in mitochondria : insight at a molecular level. *Curr Opin Struct Biol*, 14(4) :420–425, 2004.
- E Pebay-Peyroula, G Rummel, J P Rosenbusch, et E M Landau. X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science*, 277(5332) :1676–1681, 1997.
- E Pebay-Peyroula, C Dahout-Gonzalez, R Kahn, V Trézéguet, G J Lauquin, et G Brandolin. Structure of mitochondrial adp/atp carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature*, 426(6962) :39–44, 2003.
- E Pfaff, M Klingenberg, et H W Heldt. Unspecific permeation and specific exchange of adenine nucleotides in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 104(1) :312–315, 1965.
- K Pfeiffer, V Gohil, R A Stuart, C Hunte, U Brandt, M L Greenberg, et H Schägger. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem*, 278(52) : 52873–52880, 2003.
- Martin Picard, Tassadite Dahmane, Manuel Garrigos, Carole Gauron, Fabrice Giusti, Marc le Maire, Jean-Luc Popot, et Philippe Champeil. Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on the Ca^{2+} -atpase from sarcoplasmic reticulum : a comparative study. *Biochemistry*, 45(6) :1861–1869, 2006.
- Y Pierre, C Breyton, D Kramer, et J L Popot. Purification and characterization of the cytochrome b6 f complex from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*, 270 (49) :29342–29349, 1995.
- Cosmin L Pocanschi, Tassadite Dahmane, Yann Gohon, Fabrice Rappaport, Hans-Jurgen Apell, Jorg H Kleinschmidt, et Jean-Luc Popot. Amphipathic polymers : tools to fold integral membrane proteins to their active form. *Biochemistry*, 45(47) : 13954–13961, 2006.
- V Pomerleau, E Harvey-Girard, et F Boucher. Lipid-protein interactions in the purple membrane : structural specificity within the hydrophobic domain. *Biochim Biophys Acta*, 1234(2) :221–224, 1995.
- J-L Popot, E A Berry, D Charvolin, C Creuzenet, C Ebel, D M Engelman, M Flottemeyer, F Giusti, Y Gohon, Q Hong, J H Lakey, K Leonard, H A Shuman, P Timmins, D E Warschawski, F Zito, M Zoonens, B Pucci, et C Tribet. Amphipols : polymeric surfactants for membrane biology research. *Cell Mol Life Sci*, 60(8) :1559–1574, 2003.

- V Postis, C De Marcos Lousa, B Arnou, G J Lauquin, et V Trézéguet. Subunits of the yeast mitochondrial adp/atp carrier : cooperation within the dimer. *Biochemistry*, 44(45) :14732–14740, 2005.
- S J Powell, S M Medd, M J Runswick, et J E Walker. Two bovine genes for mitochondrial adp/atp translocase expressed differences in various tissues. *Biochemistry*, 28(2) :866–873, 1989.
- C Prata, F Giusti, Y Gohon, B Pucci, J L Popot, et C Tribet. Nonionic amphiphilic polymers derived from tris(hydroxymethyl)-acrylamidomethane keep membrane proteins soluble and native in the absence of detergent. *Biopolymers*, 56(2) :77–84, 2001.
- B C Pressman. Intramitochondrial nucleotides. i. some factors affecting net interconversions of adenine nucleotides. *J Biol Chem*, 232(2) :967–978, 1958.
- Yasser Qutub, Ilya Reviakine, Carrie Maxwell, Javier Navarro, Ehud M Landau, et Peter G Vekilov. Crystallization of transmembrane proteins in cubo : mechanisms of crystal growth and defect formation. *J Mol Biol*, 343(5) :1243–1254, 2004.
- M Rapp, E Granseth, S Seppälä, et G von Heijne. Identification and evolution of dual-topology membrane proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 13(2) :112–116, 2006.
- Mikaela Rapp, Susanna Seppala, Erik Granseth, et Gunnar von Heijne. Emulating membrane protein evolution by rational design. *Science*, 315(5816) :1282–1284, 2007.
- P Riccio, H Aquila, et M Klingenberg. Solubilization of the carboxy-atractylate binding protein from mitochondria. *FEBS Lett*, 56(1) :192–132, 1975a.
- P Riccio, H Aquila, et M Klingenberg. Purification of the carboxy-atractylate binding protein from mitochondria. *FEBS Lett*, 56(1) :133–138, 1975b.
- A J Robinson et E R Kunji. Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state have a common substrate binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(8) :2617–2622, 2006.
- A Royant, P Nollert, K Edman, R Neutze, E M Landau, E Pebay-Peyroula, et J Navarro. X-ray structure of sensory rhodopsin ii at 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(18) :10131–10136, 2001.
- J F Rual, K Venkatesan, T Hao, T Hirozane-Kishikawa, A Dricot, N Li, G F Berriz, F D Gibbons, M Dreze, N Ayivi-Guedehoussou, N Klitgord, C Simon, M Boxem, S Milstein, J Rosenberg, D S Goldberg, L V Zhang, S L Wong, G Franklin, S Li, J S Albala, J Lim, C Fraughton, E Llamas, S Cevik, C Bex, P Lamesch, R S Sikorski, J Vandenhaute, H Y Zoghbi, A Smolyar, S Bosak, R Sequerra, L Doucette-Stamm, M E Cusick, D E Hill, F P Roth, et M Vidal. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*, 437(7062) :1173–1178, 2005.
- X Ruan, D Li, Q Xu, H Mao, G Li, Y Gong, T Kuang, et N Zhao. Phosphatidylcholine-induced reactivation of photosystem ii membranes pretreated with triton x-100. *J Photochem Photobiol B*, 67(2) :109–115, 2002.

- Emmanuelle N Sabbah, S Druillennec, N Morellet, S Bouaziz, G Kroemer, et B P Roques. Interaction between the hiv-1 protein vpr and the adenine nucleotide translocator. *Chem Biol Drug Des*, 67(2) :145–154, 2006.
- S K Saha et C F Brewer. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr Res*, 254 :157–167, 1994.
- H Saibil, M Chabre, et D Worcester. Neutron diffraction studies of retinal rod outer segment membranes. *Nature*, 262(5566) :266–270, 1976.
- M Saraste et J E Walker. Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial adp/atp translocase. *FEBS Lett*, 144(2) :250–254, 1982.
- T Sato, Y Yamada, S Saijo, T Hori, R Hirose, N Tanaka, G Sasaki, K Nakajima, N Igarashi, M Tanaka, et Y Matsuura. Enhancement in the perfection of orthorhombic lysozyme crystals grown in a high magnetic field (10 t). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 56(Pt 8) :1079–1083, 2000.
- T Sato, Y Yamada, S Saijo, T Hori, R Hirose, et N et al. Tanaka. Improvement in diffraction maxima in orthorhombic hewl crystals grown under high magnetic field. *J Cristal Growth*, 232(1) :229–236, 2007.
- H Schagger, T Hagen, B Roth, U Brandt, T A Link, et G von Jagow. Phospholipid specificity of bovine heart bc1 complex. *Eur J Biochem*, 190(1) :123–130, 1990.
- Johannes Scheuring, Nathalie Braun, Lars Nothdurft, Matthias Stumpf, Andreas K J Veenendaal, Stefan Kol, Chris van der Does, Arnold J M Driessen, et Sevil Weinkauff. The oligomeric distribution of secyeg is altered by seca and translocation ligands. *J Mol Biol*, 354(2) :258–271, 2005.
- Simon Scheuring, Jean-Louis Rigaud, et James N Sturgis. Variable lh2 stoichiometry and core clustering in native membranes of rhodospirillum photometricum. *EMBO J*, 23(21) :4127–4133, 2004.
- Anna C Schinzel, Osamu Takeuchi, Zhihong Huang, Jill K Fisher, Zhipeng Zhou, Jeffery Rubens, Claudio Hetz, Nika N Danial, Michael A Moskowitz, et Stanley J Korsmeyer. Cyclophilin d is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(34) :12005–12010, 2005.
- Daniel Schlatter, Ralf Thoma, Erich Kung, Martine Stihle, Francis Muller, Edilio Borroni, Andrea Cesura, et Michael Hennig. Crystal engineering yields crystals of cyclophilin d diffracting to 1.7 a resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 61 (Pt 5) :513–519, 2005.
- A Schroers, A Burkovski, H Wohlrab, et R Krämer. The phosphate carrier from yeast mitochondria. dimerization is a prerequisite for function. *J Biol Chem*, 273(23) :14269–14276, 1998.
- H P Schultheiss et H D Bolte. Immunological analysis of auto-antibodies against the adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 17 (6) :603–617, 1985.

Bibliographie

- Emanuela Screpanti, Etana Padan, Abraham Rimon, Hartmut Michel, et Carola Hunte. Crucial steps in the structure determination of the na⁺/h⁺ antiporter nhaa in its native conformation. *J Mol Biol*, 362(2) :192–202, 2006.
- T Shimizu, H Mitsuke, K Noto, et M Arai. Internal gene duplication in the evolution of prokaryotic transmembrane proteins. *J Mol Biol*, 339(1) :1–15, 2004.
- T Sicheritz-Pontén, C G Kurland, et S G Andersson. A phylogenetic analysis of the cytochrome b and cytochrome c oxidase i genes supports an origin of mitochondria from within the rickettsiaceae. *Biochim Biophys Acta*, 1365(3) :545–551, 1998.
- G Siciliano, A Tessa, S Petrini, M Mancuso, C Bruno, G S Grieco, A Malandrini, L DeFlorio, B Martini, A Federico, G Nappi, F M Santorelli, et L Murri. Autosomal dominant external ophthalmoplegia and bipolar affective disorder associated with a mutation in the ant1 gene. *Neuromuscul Disord*, 13(2) :162–165, 2003.
- P Siekevitz et V R Potter. Biochemical structure of mitochondria. ii. radioactive labeling of intra-mitochondrial nucleotides during oxidative phosphorylation. *J Biol Chem*, 215(1) :237–255, 1955.
- Libor Skarka, Kristina Bardova, Petr Brauner, Pavel Flachs, Daniela Jarkovska, Jan Kopecky, et Bohuslav Ostadal. Expression of mitochondrial uncoupling protein 3 and adenine nucleotide translocase 1 genes in developing rat heart : putative involvement in control of mitochondrial membrane potential. *J Mol Cell Cardiol*, 35(3) :321–330, 2003.
- B L Smith et P Agre. Erythrocyte mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *J Biol Chem*, 266(10) :6407–6415, 1991.
- V R Smith, I M Fearnley, et J E Walker. Altered chromatographic behaviour of mitochondrial adp/atp translocase induced by stabilization of the protein by binding of 6'-o-fluorescein-actyloside. *Biochem J*, 376(Pt 3) :757–763, 2003.
- G Stepien, A Torroni, A B Chung, J A Hodge, et D C Wallace. Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J Biol Chem*, 267(21) :14592–14597, 1992.
- D Stock, A G Leslie, et J E Walker. Molecular architecture of the rotary motor in atp synthase. *Science*, 286(5445) :1700–1705, 1999.
- Pavel Strop et Axel T Brunger. Refractive index-based determination of detergent concentration and its application to the study of membrane proteins. *Protein Sci*, 14(8) :2207–2211, 2005.
- Kitaru Suda, Slawomir Filipek, Krzysztof Palczewski, Andreas Engel, et Dimitrios Fotiadis. The supramolecular structure of the gpcr rhodopsin in solution and native disc membranes. *Mol Membr Biol*, 21(6) :435–446, 2004.
- Fei Sun, Xia Huo, Yujia Zhai, Aojin Wang, Jianxing Xu, Dan Su, Mark Bartlam, et Zihe Rao. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex ii. *Cell*, 121(7) :1043–1057, 2005.

- Patrick C K Tam, Antoine P Maillard, Kenneth K Y Chan, et Franck Duong. Investigating the secyeg plug movement at the secyeg translocation channel. *EMBO J*, 24 (19) :3380–3388, 2005.
- S Thuswaldner, J O Lagerstedt, M Rojas-Stütz, K Bouhidel, C Der, N Leborgne-Castel, A Mishra, F Marty, B Schoefs, I Adamska, B L Persson, et C Spetea. Identification, expression and functional analyses of a thylakoid atp/adp carrier from arabidopsis. *J Biol Chem*, 2007.
- P Timmins, E Pebay-Peyroula, et W Welte. Detergent organisation in solutions and in crystals of membrane proteins. *Biophys Chem*, 53(1-2) :27–36, 1994a.
- P Timmins, E Pebay-Peyroula, et W Welte. Detergent organisation in solutions and in crystals of membrane proteins. *Biophys Chem*, 53(1-2) :27–36, 1994b.
- J Torbet. Internal structural anisotropy of spherical viruses studied with magnetic birefringence. *EMBO J*, 2(1) :63–66, 1983.
- A Torroni, T G Schurr, M F Cabell, M D Brown, J V Neel, M Larsen, D G Smith, C M Vullo, et D C Wallace. Asian affinities and continental radiation of the four founding native american mtdnas. *Am J Hum Genet*, 53(3) :563–590, 1993.
- C Toyoshima, M Nakasako, H Nomura, et H Ogawa. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 a resolution. *Nature*, 405(6787) :647–655, 2000.
- V Trézéguet, A Le Saux, C David, C Gourdet, C Fiore, A Dianoux, G Brandolin, et G J Lauquin. A covalent tandem dimer of the mitochondrial adp/atp carrier is functional in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1457(1-2) :81–93, 2000.
- T Tsukihara, H Aoyama, E Yamashita, T Tomizaki, H Yamaguchi, K Shinzawa-Itoh, R Nakashima, R Yaono, et S Yoshikawa. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 a. *Science*, 272(5265) :1136–1144, 1996.
- W S Valdar et J M Thornton. Conservation helps to identify biologically relevant crystal contacts. *J Mol Biol*, 313(2) :399–416, 2001.
- Bert Van den Berg, William M Jr Clemons, Ian Collinson, Yorgo Modis, Enno Hartmann, Stephen C Harrison, et Tom A Rapoport. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, 427(6969) :36–44, 2004.
- W van Klompenburg, I Nilsson, G von Heijne, et B de Kruijff. Anionic phospholipids are determinants of membrane protein topology. *EMBO J*, 16(14) :4261–4266, 1997.
- A M Viale, A K Arakaki, F C Soncini, et R G Ferreyra. Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from groel (chaperonin) sequence comparisons. *Int J Syst Bacteriol*, 44(3) :527–533, 1994.
- P M Vignais, G Brandolin, G J Lauquin, et J Chabert. 3h- or 35s-labeled atractyloside and carboxyatractyloside, atractyloside derivatives used for affinity chromatography, photoaffinity labeling, and spin labeling, and 3h- or 35s-labeled bongkreic acid. *Methods in Enzymology*, LV(60) :518–532, 1979.

Bibliographie

- P V Vignais. Molecular and physiological aspects of adenine nucleotide transport in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 456(1) :1–38, 1976.
- P V Vignais, P M Vignais, et E Stanislas. Action of potassium atractylate on oxidative phosphorylation in mitochondria and in submitochondrial particles. *Biochim Biophys Acta*, 60 :284–300, 1962.
- P V Vignais, P M Vignais, et G Defaye. Adenosine diphosphate translocation in mitochondria. nature of the receptor site for carboxyatractyloside (gummiferin). *Biochemistry*, 12(8) :1508–1519, 1973.
- PV Vignais, PM Vignais, et G Defaye. Gummiferin, an inhibitor of the adenine-nucleotide translocation. study of its binding properties to mitochondria. *FEBS Lett*, 17(2) :281–288, 1971.
- J E Walker et M J Runswick. The mitochondrial transport protein superfamily. *J Bioenerg Biomembr*, 25(5) :435–446, 1993.
- E Wallin et G von Heijne. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci*, 7(4) :1029–1038, 1998.
- T Walz, B L Smith, M L Zeidel, A Engel, et P Agre. Biologically active two-dimensional crystals of aquaporin chip. *J Biol Chem*, 269(3) :1583–1586, 1994.
- Chaille T Webb, Michael A Gorman, Michael Lazarou, Michael T Ryan, et Jacqueline M Gulbis. Crystal structure of the mitochondrial chaperone tim9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol Cell*, 21(1) :123–133, 2006.
- Stephen H White. The progress of membrane protein structure determination. *Protein Sci*, 13(7) :1948–1949, 2004.
- K Woodfield, A Ruck, D Brdiczka, et A P Halestrap. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-d and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J*, 336 (Pt 2) :287–290, 1998.
- D L Worcester. Structural origins of diamagnetic anisotropy in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(11) :5475–5477, 1978.
- T L Yahr et W T Wickner. Evaluating the oligomeric state of secyeg in preprotein translocase. *EMBO J*, 19(16) :4393–4401, 2000.
- Naoshi Yamazaki, Yasuo Shinohara, Kayo Tanida, et Hiroshi Terada. Structural properties of mammalian mitochondrial adp/atp carriers : identification of possible amino acids that determine functional differences in its isoforms. *Mitochondrion*, 1 (4) :371–379, 2002.
- D Yang, Y Oyaizu, H Oyaizu, G J Olsen, et C R Woese. Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(13) :4443–4447, 1985.
- Richard J Youle et Mariusz Karbowski. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(8) :657–663, 2005.